

Université de Sherbrooke

**MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DU SUCCINYLLACÉTONE
PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET VALIDATION DE LA MÉTHODE SUR
DES LIQUIDES BIOLOGIQUES DE PATIENTS SOUFFRANT DE
TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE DE TYPE I**

Par

Denis Cyr

Service de Génétique
Département de Pédiatrie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

Novembre 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-17295-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-17295-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

<u>LISTE DES FIGURES</u>	V
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	VI
<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u>	VIII
<u>RÉSUMÉ</u>	
<u>INTRODUCTION</u>	1
1. Les maladies métaboliques et le laboratoire de génétique biochimique.....	1
2. La tyrosinémie héréditaire de type I.....	3
2.1 Les rappels historiques.....	4
2.2 Les aspects biochimiques et génétiques.....	4
2.3 L'évolution des outils diagnostiques.....	7
2.4 Les manifestations cliniques, les traitements et le suivi des patients.....	9
2.5 Les particularités Québécoises de la TH1	11
3. La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS).....	12
3.1 Le GC/MS : les principes de fonctionnement.....	12
3.2 L'essor de la spectrométrie de masse en clinique.....	13
4. La mise au point de la méthode.....	15
4.1 Le principe d'extraction.....	16
4.2 L'oximation.....	17
4.3 La dérivation pré-injection.....	19
4.4 L'utilisation de l'isotope stable.....	20
5. Les critères de validation d'une méthode analytique.....	21
6. Les objectifs du projet.....	23

RÉSULTATS..... 25

L'ARTICLE: A GC/MS validated method for the nanomolar range determination of succinylacetone in amniotic fluid and plasma : an analytical tool for tyrosinemia type I..... 26

Abstract.....	28
1- Introduction.....	29
2- Methodology, design.....	31
2.1 Chemicals and reagents.....	31
2.2 Sample extraction and derivatization.....	31
2.3 GC/MS analysis.....	32
2.4 Method validation.....	32
2.4.1 Molecule stability.....	32
2.4.2 Recovery and assay precision.....	33
2.4.3 Linearity, limit of detection and quantification.....	33
2.5 Samples.....	33
3- Results and discussion.....	35
3.1 Sample treatments and chromatography.....	35
3.2. Method validation.....	37
3.3. Clinical applications.....	38
4. Conclusion.....	39
Acknowledgements.....	40
References.....	41
Figure legends.....	43
Tables.....	44
Figures.....	46

DISCUSSION et CONCLUSION..... 52

1. La justification de l'étude et l'atteinte des objectifs.....	52
2. Les avantages et les désavantages des outils analytiques	53
3. La validation : démarche et interprétation.....	56
4. L'application clinique.....	58
5. La conclusion et les perspectives	63

REMERCIEMENTS..... 65

RÉFÉRENCES..... 66

<u>ANNEXES</u>	71
La réponse de l'éditeur.....	72
Le dosage du SA par GC/MS : le protocole analytique.....	74
La lettre d'approbation des co-auteurs.....	75

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1.	Les erreurs innées du métabolisme, l'énoncé selon Garrod.....	2
Figure 2.	La voie catabolique de la tyrosine.....	6
Figure 3.	La réaction catalytique et l'inhibition de l'ALA-D.....	8
Figure 4.	La voie catabolique de la tyrosine chez un patient atteint d'TH1 et le site d'action du NTBC.....	10
Figure 5.	La schématisation d'un GC/MS.....	14
Figure 6.	La structure chimique du SA (acide 4,6-dioxoheptanoïque).....	15
Figure 7.	La tautomérisation céto-énol des groupements cétones et la stabilisation de la forme énol par une liaison hydrogène intramoléculaire.....	18
Figure 8.	Les modifications moléculaires du SA suite à l'oximation (A) et à la triméthylsilylation (B).....	19

RÉSULTATS

L'ARTICLE.....	25
Figure 1. Pathway of tyrosine degradation.....	46
Figure 2. GC/MS ion chromatogram of SIM analysis of four isomers of the SA derivatives.....	47

Figure 3.	Comparative GC/MS chromatograms (SIM).....	48
Figure 4.	Mass spectra of succinylacetone dioxime-TMS.....	49
Figure 5.	Chromatogram obtained from amniotic fluid of an HT1 fetus.....	50
Figure 6.	SA profile of plasma concentrations over in an HT1 patient following initiation of NTBC treatment.....	51

DISCUSSION et CONCLUSION

Figure 9.	Les valeurs de référence du SA dans le LA de fœtus normaux versus fœtus atteints.....	59
Figure 10.	Les valeurs de référence plasmatiques du SA chez des patients normaux versus des patients traités au NTBC.....	60
Figure 11.	Les valeurs de référence urinaires du SA chez des patients normaux versus des patients traités au NTBC.....	61

LISTE DES TABLEAUX

RÉSULTATS

L'ARTICLE.....	25
Table 1. Precision and accuracy of the assay in amniotic fluid.....	44
Table 2. Plasma and amniotic fluid SA concentration in the control group and HT1 patients.....	45

DISCUSSION et CONCLUSION

Tableau 3.	Les valeurs urinaires du SA pour les patients HT1 et les contrôles.....	62
------------	---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACMG	American College of Medical Genetics
AF	Amniotic fluid – liquide amniotique
AFP	Alpha-foeto protéine
ALA	Amino levulenic acid – acide aminolévulinique
ALA-D	Amino levulenic acid dehydratase – acide aminolévulinique déshydratase
BSTFA	N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide
¹³ C	Carbone 13 (isotope stable)
¹³ C5-SA	Succinylacétone constitué de 5 carbones 13
CE	Capillary electrophoresis – électrophorèse par capillaire
CORAMH	Corporation de Recherche et d'Action sur les Maladies Héritaires
CV	Coefficient de variation
Da	Dalton
DBS	Dried blood spot – sang séché sur papier filtre
EIM	Erreurs innées du métabolisme
E.T.	Écart type
FAA	Fumarylacétocétate
FAH	Fumarylacétoacétate hydrolase
GC	Gaz chromatography – chromatographie en phase gazeuse
GC/MS	Gaz chromatography/mass spectrometry – chromatographie en phase gazeuse avec spectromètre de masse
² H	Deutérium
HCL	Chlorure d'hydrogène
4HPPD	4-hydroxyphénylpyruvique dioxygénase
HT1	Hereditary tyrosinemia type I – tyrosinémie héréditaire de type I
ISO	International standard organisation – Organisation internationale de normalisation
ISTD	Internal standard – standard interne
LA	Liquide amniotique
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry – spectromètre de masse avec chromatographie en phase liquide
LC-MS/MS	Liquid chromatography/tandem mass spectrometry – spectromètre de masse en tandem avec chromatographie en phase liquide
LOD	Limite of detection – limite de détection
LOQ	Limite of quantification – limite de quantification
MAA	Maléylacétoacétate
M+H	Masse moléculaire protonée
mmol créat.	Millimole de créatinine
ms	Milliseconde
MS	Mass spectrometry - spectrométrie de masse
MS/MS	Spectromètre de masse en tandem
m/z	Ratio masse/charge
nmol/L	Nanomole par litre
NTBC	2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione
PFBO	O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride

RT	Room temperature – température de la pièce
SA	Succinylacetone – succinylacétone
S.D.	Standard deviation – déviation standard
SIM	Selected ion monitoring – balayage d'ions sélectionnés
SLSJ	Saguenay-Lac-St-Jean
SPE	Solid phase extraction – extraction en phase solide
TH1	Tyrosinémie héréditaire de type I
TMS	Triméthylsilyl
TMCS	Triméthylchlorosilane
μl	Microlitre
umol/L	Micromole par litre

RÉSUMÉ

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DU SUCCINYLACÉTONE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET VALIDATION DE LA MÉTHODE SUR DES LIQUIDES BIOLOGIQUES DE PATIENTS SOUFFRANT DE TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE DE TYPE I

Par Denis Cyr
Service de génétique
Département de pédiatrie
Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

La tyrosinémie héréditaire de type I est un désordre génétique causé par l'absence d'activité de l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase impliquée dans le catabolisme de la phénylalanine. Le succinylacétone (SA), biomarqueur spécifique, origine de l'accumulation du fumarylacétoacétate causée par la déficience enzymatique. Lors du diagnostic, la concentration du SA chez un patient atteint de tyrosinémie héréditaire de type I varie entre 20 à 700 $\mu\text{mol/L}$ et peut facilement être mesuré par des méthodes existantes. Dû à un effet fondateur, l'incidence de la tyrosinémie héréditaire de type I est particulièrement élevée dans la province de Québec. La quantification du SA dans un intervalle de mesure de 1 à 1000 nmol/L dans le liquide amniotique (LA) et dans le plasma ou l'urine des patients traités au NTBC (2-(2-nitro-4-triflorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) est donc pour nous le but à atteindre. Nous avons atteint ce but grâce à la spectrométrie de masse, en mettant au point une méthode de dosage utilisant un procédé de dilution à l'isotope stable. La technique est optimisée par l'utilisation d'un standard interne isotopique, le $^{13}\text{C}_5\text{-SA}$ et le traitement des échantillons en trois étapes : l'oximation

(protection des groupements cétones), une extraction liquide-liquide et une dérivation pré-injection à l'aide du bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamine (BSTFA). Nous avons validé la méthode en ciblant les ions spécifiques m/z 620 pour le SA et 625 pour le $^{13}\text{C5}$ -SA. La validation devra évaluer : *L'exactitude analytique* par des expériences de récupération et de vérification de la spécificité de la méthode. *La précision analytique* en évaluant les coefficients de variation intra-essais et inter-essais. *La sensibilité analytique* par l'évaluation de la courbe de calibration et le coefficient de corrélation. *Les limites de quantification et de détection* sont en relation étroite avec la sensibilité analytique et sont inclus dans le processus de validation. Finalement nous avons étudié la stabilité du métabolite à doser. Nos travaux montre une récupération moyenne est de 95.7% et la méthode dose spécifiquement le SA et ce grâce à la spectrométrie de masse et au patron chromatographique très caractéristique. De plus, nous avons déterminés les coefficients de variation intra-essais et inter-essais qui varient entre 0.2 à 3.2 % et 1.9 à 5.6% respectivement, une courbe de calibration avec un coefficient de corrélation de 0.999, des limites de détection et de quantification de 1 et 3 nmol/L. Finalement, nous avons montré que les échantillons ne pouvant être analysés avant une semaine doivent être maintenus à -80°C afin de rester stable. Les valeurs de référence calculées sont de 3 nmol/L dans le LA (n=30, intervalle : 0 – 13, E.T.=3), de 13 nmol/L dans le plasma (n=30, intervalle : 3 – 21, E.T.= 3) et de 11 nmol/mmol de créatinine dans l'urine (n=30, intervalle : 5 – 28, E.T.= 6). L'utilité de la méthode fût démontrée en quantifiant le SA dans des LA de fœtus atteints de la maladie ainsi que dans les plasmas et urines de patients traités au NTBC. Nos résultats démontrent que cette méthode est efficace et applicable au niveau clinique. Notre étude est la première ayant montrer la réponse pharmacologique dans les taux plasmatiques de SA suite à l'initiation du NTBC chez un nouveau patient diagnostiqué et pendant les 15 semaines suivantes. En conclusion, la validation de cette technique de dosage par

spectrométrie de masse permettra maintenant le dépistage et le suivi de patients tyrosinémiques avec toute l'exactitude, la spécificité, la précision, et la sensibilité analytique requises.

Mots clés généraux :

Tyrosinémie – Succinylacétone – Spectrométrie de masse – NTBC – Erreurs innées du métabolisme -

INTRODUCTION

1. Les maladies métaboliques et le laboratoire de génétique biochimique

On appelle « laboratoire de génétique biochimique » un laboratoire qui est spécialisé dans le diagnostic des erreurs innées de métabolisme (EIM), communément appelées : maladies métaboliques. Celui-ci diffère du laboratoire de biochimie clinique dans la mesure où les analyses qui y sont effectuées sont orientées spécifiquement vers la détection d'EIM. De plus, lorsqu'une maladie métabolique est soupçonnée, les professionnels oeuvrant en génétique biochimique sont appelés à utiliser tout les moyens dont ils disposent pour trouver ou éliminer toutes EIM connues et même de scruter toutes anomalies biochimiques qui pourraient orienter vers un nouveau désordre du métabolisme. Un laboratoire de biochimie clinique doit performer dans le dosage individuel de molécules impliquées dans la biochimie humaine. Pour sa part, un laboratoire de génétique biochimique doit performer dans l'identification des EIM.

Brièvement, l'étiologie des EIM peut être expliquée comme suit : le métabolisme est l'ensemble des opérations biochimiques qui s'effectue dans l'organisme. Ces opérations sont intimement contrôlées par des réactions enzymatiques. La synthèse de ces enzymes est régie par l'expression de différents gènes. Suite à une mutation génique acquise ou transmise de façon héréditaire, surviendra une erreur au niveau du métabolisme causée par la synthèse déficiente d'une enzyme. Lorsqu'une enzyme est déficiente, le métabolite qui ne peut plus être transformé s'accumule dans l'organisme et est à l'origine d'une

symptomatologie variable allant de l'affection bénigne à la mort néonatale (figure 1). La plupart des EIM ont une transmission héréditaire de type autosomale récessive.

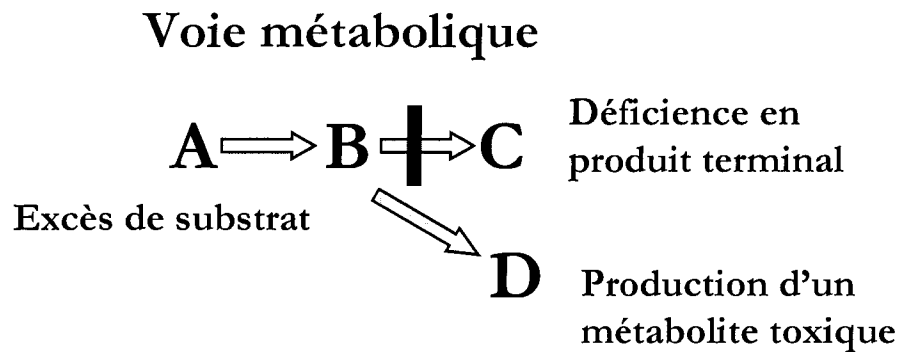


Figure 1. Les erreurs innées du métabolisme, l'énoncé selon Garrod. L'expression « erreurs innées du métabolisme » fût utilisée pour la première fois par le Dr A. Garrod (Garrod, 1902). Celui-ci proposa que l'origine des symptômes reliés à une déficience enzymatique d'une voie métabolique *X* était causée soit par un excès de substrats, soit à une déficience en produits terminaux ou à la production d'un métabolite toxique dérivé du surplus de substrats. Aujourd'hui nous savons que des déficiences en protéines de transport et dans des interactions cofacteur-apoenzyme peuvent être à l'origine d'EIM. De plus, dans certains désordres métaboliques, l'excès de substrats peut inhiber une seconde réaction enzymatique (McInnes et Clarke, 2002).

Les travaux faisant l'objet du présent mémoire ont été effectués dans le laboratoire de génétique biochimique du CHUS et avaient pour but la mise au point et la validation d'une technique de dosage du SA. Cette technique, utilisant les progrès technologiques associés à des outils analytiques de pointe telle la spectrométrie de masse, doit combler les besoins précis de diagnostic et de suivi thérapeutique reliés à une maladie métabolique particulière : la tyrosinémie héréditaire de type I (TH1). La TH1 à l'instar des autres EIM fut identifiée grâce à la détection de métabolites endogènes anormalement accumulés dans les liquides biologiques ou tissus (Rinaldo et coll., 2004).

2. La tyrosinémie héréditaire de type I

Le millier d'EIM recensées jusqu'à présent peuvent être séparées en 2 grands groupes : les EIM reliées au métabolisme des micromolécules (acides aminés, acides organiques, acylcarnitines, sucres simples, purines, pyrimidines et autres) et celles reliées au métabolisme des macromolécules (glycoprotéines, lipides complexes, glycoaminoglycanes et autres). La TH1 est une maladie métabolique des micromolécules reliée à la dégradation protéique et au catabolisme des acides aminés. Au Québec, l'augmentation de la tyrosine urinaire observée pour la première fois dans les années 60 chez des enfants gravement malades, donnera à la province une particularité génétique maintenant connue à travers le monde médical.

2.1 Les rappels historiques

L'acide aminé L-tyrosine fût purifié pour la première fois en 1849 (Bopp, 1849). La forme alpha est la seule forme métabolisable chez l'humain et autres mammifères. Dans les années 1950, les désordres métaboliques détectés par la chromatographie des acides aminés se limitent à quelques déficiences enzymatiques affectant le catabolisme des acides aminés, permettant ainsi le diagnostic d'un nombre restreint d'acido-aminopathies (Cyr et coll. 1995). Ceci est dû essentiellement à la caractéristique qu'ont les acides aminés de réagir, grâce à leur fonction amine, avec un composé appelé ninhydrine qui produit une coloration variable selon l'acide aminé impliqué dans la réaction. L'augmentation de la tyrosine dans les urines d'un patient avec atteintes hépatique et rénale (la TH1 est connu aussi sous le vocable de tyrosinémie hépato-rénale) fût rapportée pour la première fois en 1957 (Sakai et coll., 1957). Au Québec, c'est au début des années 1960 que certains pédiatres de la région de Chicoutimi s'inquiètent d'un taux élevé de cirrhose du foie chez de jeunes enfants (Larochelle et coll., 1967). Quelques années plus tard, on identifia la TH1 comme étant la cause de l'incidence élevée des désordres hépatiques chez des patients d'âge pédiatrique dans cette région du Québec (Scriver et coll., 1967).

2.2 Les aspects biochimiques et génétiques

Chez les mammifères, la tyrosine est fournie à l'organisme soit par l'hydrolyse des protéines issue de la diète ou soit par l'hydroxylation d'un acide aminé essentiel : la phénylalanine. La tyrosine est un acide aminé précurseur direct de la mélanine, de la

thyroxine, une hormone thyroïdienne primaire, aussi bien que de l'adrénaline de la noradrénaline et de la dopamine. Essentiellement, dans l'organisme, la tyrosine sera soit incorporée dans des protéines ou soit dégradée via une série de réactions enzymatiques (figure 2). Les réactions cataboliques sont cytoplasmiques et ont lieu majoritairement dans les cellules hépatiques (Mitchell et coll., 2001). La TH1 est causée par la déficience en fumarylacétoacétate hydrolase (FAH) (E.C.3.7.1.2), la dernière enzyme du catabolisme de la tyrosine, ce qui occasionne une augmentation des métabolites en amont tels la tyrosine mais surtout le fumarylacétoacétate (FAA) et le maleylacétoacétate (MAA) qui seront transformés en succinylacétone (SA) (acide 4,6-dioxoheptanoïque).

La tyrosine fût, à l'origine, le marqueur biochimique orientant vers les tyrosinémies de différents types, dont les types I et II, les plus connus à l'époque. Parce qu'elle pouvait augmenter suite à une apport exogène ou spontanément de façon transitoire (Rice et coll., 1989; Hendriksz et Walter, 2004), elle manquait de spécificité pour le dépistage de la TH1. Pour cette raison la recherche d'autres marqueurs c'est avérée nécessaire. Le SA, retrouvé normalement à de très faibles concentrations dans les liquides biologiques (ordre du nmol/L), est maintenant considéré comme le biomarqueur hautement spécifique pour le diagnostic de la TH1.

La tyrosinémie est une maladie héréditaire récessive causée par la déficience en FAH. Le gène de la FAH fut découvert en 1991 (Phaneuf et coll., 1991) et localisé sur le chromosome 15q23-q25. Un an plus tard on identifie la première mutation causant la maladie (Phaneuf et coll., 1992). En 2001 on dénombrait à travers le monde 35 mutations

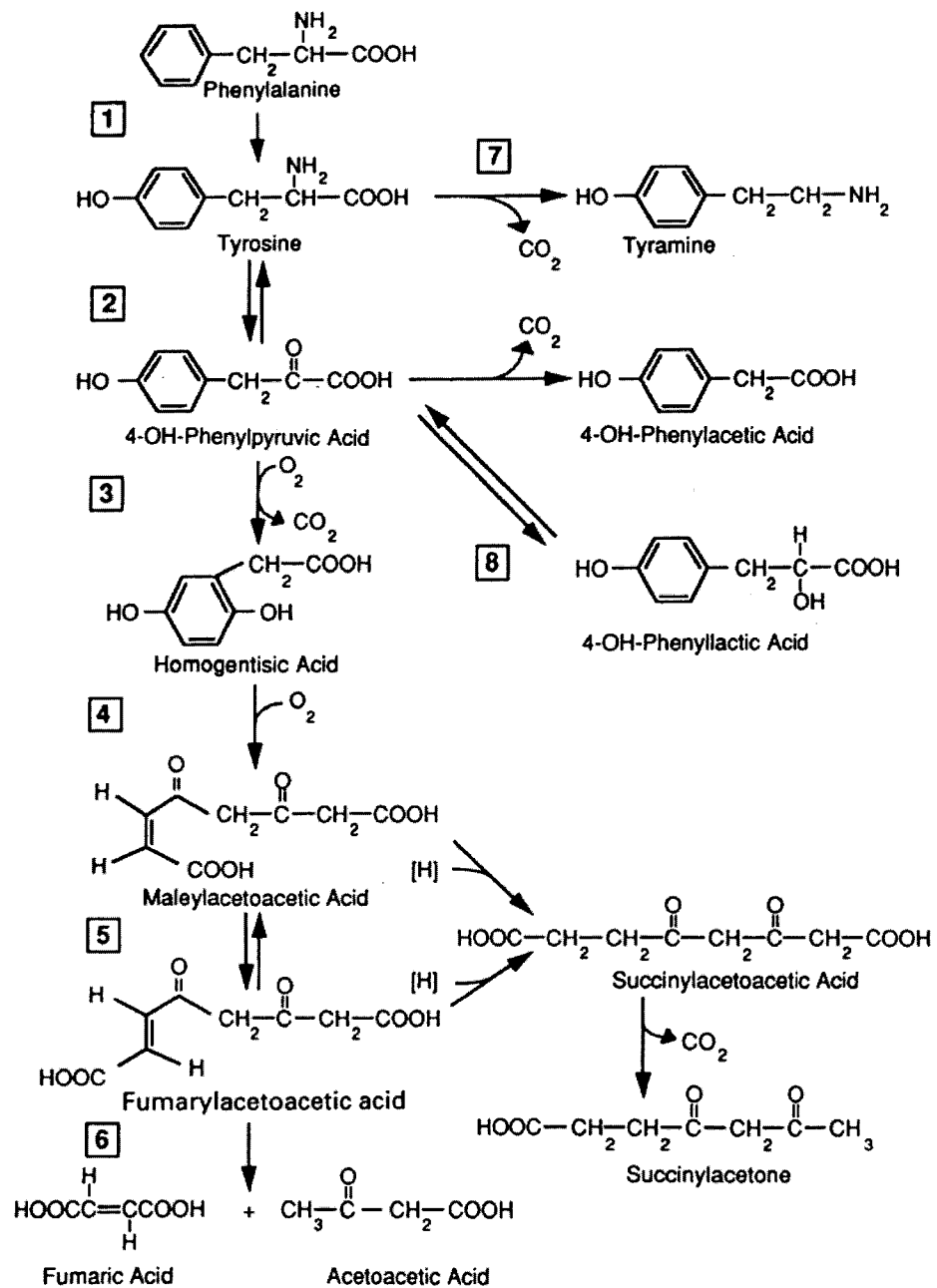


Figure 2. La voie catabolique de la tyrosine. (1) phénylalanine hydroxylase, (2) tyrosine aminotransférase, (3) 4-hydroxyphénylpyruvique dioxygénase, (4) homogentisique oxydase, (5) maleylacétoacétique isomérase, (6) fumarylacétoéacétique hydrolase. Pour les réactions (7) et (8) les enzymes n'ont pas été identifiés. (schéma tiré de Mitchell et coll., 2001).

différentes causant la TH1 (Russo et coll., 2001). Aujourd'hui près de 50 mutations sont connues mais, dans tous les cas de TH1 étudiés au Québec et, particulièrement au Saguenay-Lac-St-Jean (SLSJ), une seule et même mutation soit une mutation d'épissage à l'intron 12 cause la maladie. (Grompe et coll., 1994).

2.3 L'évolution des outils de diagnostics

Historiquement, le dosage colorimétrique de la tyrosine suite à une coloration à la ninhydrine fut le premier test diagnostique de la TH1. Pour le dépistage de masse dans une population à haut risque, le dosage fluorométrique de la tyrosine plasmatique ou sur sang séché sur papier filtre (dried blood spot, DBS) fut utilisé initialement (Grenier et Laberge, 1974). À cause du manque de spécificité de ce dernier, le dosage de l'alpha-feto protéine (AFP) sera ensuite utilisé comme test complémentaire et ce, jusqu'à la découverte du SA comme marqueur pathognomonique (Lindblad et coll., 1977). Le SA étant un inhibiteur de l'enzyme delta-aminolévulinique déshydratase (ALA-D), on utilisera cette propriété pour le quantifier en mesurant par spectrophotométrie l'absence de porphobilinogène normalement produit par l'ALA-D en présence de 2 molécules d'acide aminolévulinique (ALA), (figure 3) (Grenier et Lescault, 1985).

Dans le but d'améliorer la spécificité et la sensibilité analytique du test de dépistage, plusieurs équipes ont mis au point des méthodes analytiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS) qui offre une meilleure spécificité analytique. Au début, les techniques se limitent au dosage

urinaire par spectrométrie de masse et visent essentiellement le diagnostic postnatal (Tuchman et coll., 1984). Ces techniques furent adaptées pour des dosages du SA plasmatique, urinaire et dans le LA réalisant ainsi l'établissement de valeurs de références (Jakobs et coll., 1988).

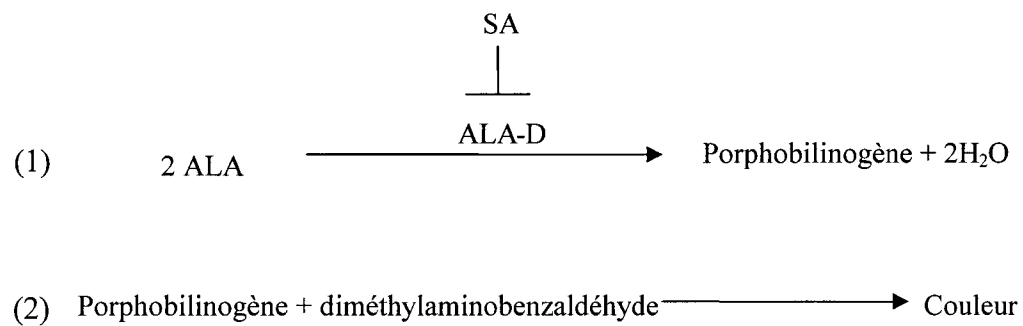


Figure 3. La réaction catalytique et l'inhibition de l'ALA-D. L'ALA-D catalyse la conversion de 2 molécules d'ALA en porphobilinogène (1). Ce dernier réagit ensuite avec le réactif de Ehrlich (diméthylaminobenzaldéhyde) produisant une coloration quantifiable par spectrophotométrie (2). En présence de SA, il y aura une absence de couleur.

Grâce à toutes ces procédures analytiques pour la détection du SA, les cliniciens et les patients pourront bénéficier subséquemment de la vérification de l'activité de la FAH (Kvittingen et Brodtkorb, 1986) ou de la mutation génique (Grompe et coll., 1994).

2.4 Les manifestations cliniques, les traitements et le suivi des patients

L'accumulation des déchets métaboliques toxiques altère, d'abord, le foie puis les reins. Dans la forme « québécoise », l'hépatomégalie est précoce avec des troubles graves de la coagulation et des problèmes rénaux (Paradis, 1996). Le pronostic est essentiellement lié à l'âge et au moment où les premiers symptômes apparaissent. Jusqu'au début des années 1980, le traitement reposait uniquement sur un régime restreint en tyrosine et en phénylalanine. À cette époque, le taux de survie ne dépassait pas 40% à 1 an (Van Spronsen et coll., 1994). Les premières greffes du foie ont alors été effectuées, ce qui a permis d'augmenter le taux de survie à plus de 60% (Yandza et coll., 1994). Depuis 1992, le traitement avec le 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), un inhibiteur de la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (4HPPD) est la voie thérapeutique de choix (Lindstedt et coll., 1992). En inhibant un enzyme en amont, le NTBC réduit drastiquement la production de MAA, FAA et SA occasionnée par la déficience en FAH mais augmente du même coup le taux de tyrosine (figure 4). Une diète faible en tyrosine est donc introduite parallèlement au traitement au NTBC. Différents dosages biochimiques sont effectués pendant le suivi des patients sous NTBC : alpha-foetoprotéine, ALA, tyrosine et le SA plasmatique.

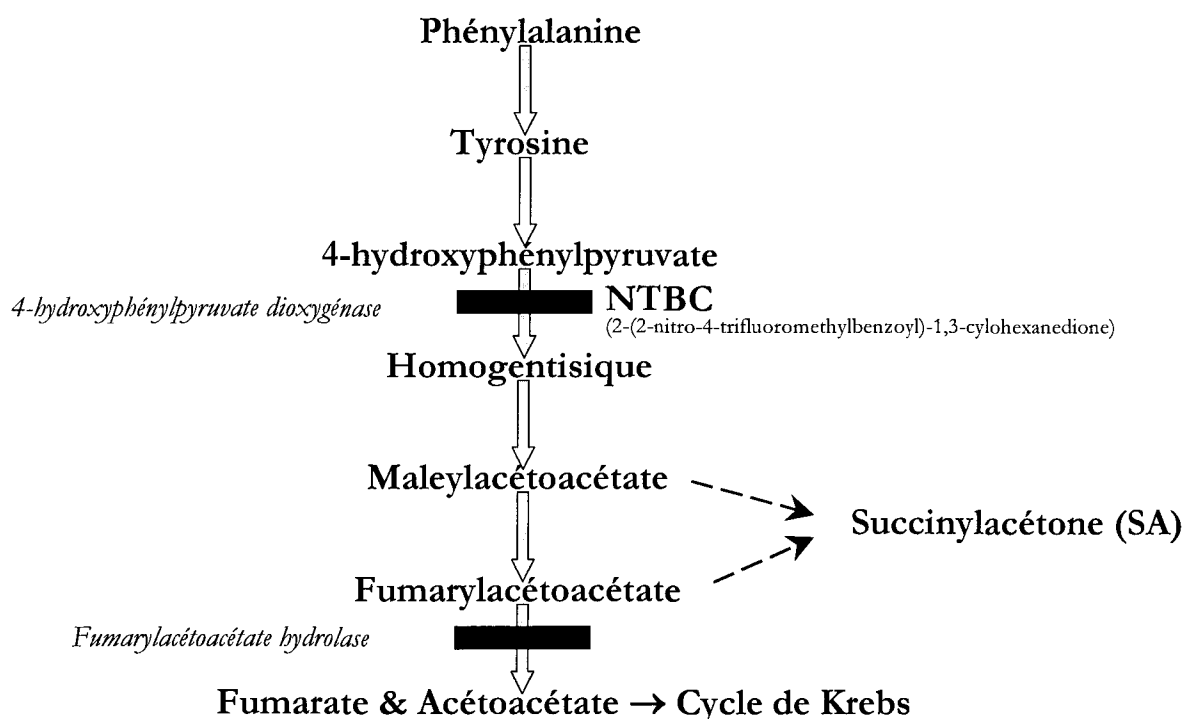


Figure 4. La voie catabolique de la tyrosine chez un patient atteint d'TH1 et le site d'action du NTBC.

Présentement, le dosage du SA pour les cas de TH1 du Québec s'effectue dans le cadre d'une étude internationale (Holme et Lindstedt, 1998), dans un laboratoire de l'Université Göteborg en Suède fournissant une limite de sensibilité de 1 $\mu\text{mol/L}$. Cette limite est amplement suffisante pour évaluer la réponse au traitement pharmacologique. Cependant, l'écart entre les taux de SA chez un patient traité et un individu sain ne peut être évalué par la méthode suédoise.

2.5 Les particularités québécoises de la TH1

La province de Québec a une incidence élevée de TH1 soit de 1/19 700 en date du 31/03/2004. Elle est particulièrement élevée au SLSJ où elle est de 1/1 846 avec un taux de porteur à 1/20 (Russo et coll., 2001) en comparaison à une incidence de 1/100 000 à 1/120 000 pour le reste du monde. Calculée depuis l'instauration du dépistage néonatal en 1970, l'incidence québécoise diminue graduellement au fil des ans et ce phénomène est relié directement à la prévention, au traitement et à l'immigration. Les maladies héréditaires dites du SLSJ sont en majorité récessives et leur incidence élevée est expliquée par "l'effet fondateur". De 1675 à 1850, 600 personnes seulement se sont installées dans la région de Charlevoix avec une descendance moyenne de 10 enfants par famille. En 1840, on ouvre la région du SLSJ à l'immigration. Jusqu'en 1911, 75% des immigrants originent de Charlevoix (De Braekeleer et Larochelle, 1990), créant ainsi un effet fondateur puisque les patients atteints ont tous des ancêtres communs du 17^{ième} siècle, provenant surtout du Perche et de la Normandie en France. Ces ancêtres ont introduit une mutation génique rare à la base, dans une population peu nombreuse, isolée géographiquement ; donc avec une immigration faible, diminuant ainsi le « brassage » génétique. En ajoutant à cela une forte natalité, il en résulte une augmentation du taux de porteurs et, par conséquent de personnes atteintes. C'est la conséquence de l'effet fondateur et non du mythe de la consanguinité propagé à tort.

3. La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS)

Seule la spectrométrie de masse combine la spécificité et la sensibilité analytiques requises pour le dosage du SA. Une méthode directe de dosage du SA peut maintenant être développée utilisant un GC/MS de dernière technologie. Cette technologie permet d'offrir le dosage du SA à un coût accessible pour un grand nombre de laboratoires.

3.1 Le GC/MS : les principes de fonctionnement

Un chromatographe en phase gazeuse est composé d'un injecteur, d'un four muni d'une colonne capillaire et d'un détecteur, en l'occurrence le spectromètre de masse. L'échantillon est introduit à l'aide d'une seringue dans la colonne via l'injecteur. Un gaz vecteur, l'hélium, entraîne ensuite l'échantillon avec lui jusqu'au détecteur. Le four, dont la température est réglable, permet la séparation plus ou moins rapide des constituants injectés. Plus la température est élevée, plus la séparation est rapide. Toutefois, il convient de commencer à une température légèrement inférieure à celle de vaporisation du solvant. La colonne capillaire se caractérise par sa longueur, son diamètre interne, ainsi que la nature et l'épaisseur de sa phase stationnaire que l'on choisira en fonction de la nature des molécules à analyser. La colonne aboutit enfin au spectromètre de masse. La spectrométrie de masse (MS) permet la détermination de la masse des fragments de molécules après ionisation de la molécule. Ainsi, des informations sur la nature et la structure de ces molécules sont recueillies. La molécule, sortant de la colonne capillaire, est introduite dans

la source d'ionisation du MS. L'ionisation est alors induite par un faisceau d'électrons émis par un filament de tungstène chauffé qui bombarde la molécule produisant ainsi des fragments chargés positivement et spécifiques au composé analysé. Chaque ion produit est sélectionné en fonction de son rapport masse/charge (m/z) et apparaît dans le spectre de masse (figure 5).

3.2 L'essor de la spectrométrie de masse en clinique

La spectrométrie de masse est devenue une approche quasi incontournable dans l'étude et la caractérisation des biomolécules. Celle-ci a connu une expansion considérable dans la deuxième partie du XX^e siècle principalement due à des avancées technologiques. La spectrométrie de masse n'est plus un outil complexe et lourd nécessitant des utilisateurs hautement spécialisés. Elle est maintenant accessible, versatile et permet de résoudre des problèmes analytiques autrefois complexes. Au début, cette technique fût utilisée pour la caractérisation et l'identification des petites molécules volatiles au bénéfice de plusieurs maladies métaboliques héréditaires par la détection de substrats d'enzymes déficientes. L'analyse de molécules polaires intactes à haut poids moléculaire était encore impossible il y a 15 ans (Chace, 2001). Aujourd'hui le couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse permet l'analyse d'une très grande gamme de molécules allant jusqu'aux grosses protéines et ce, grâce à de nouvelles techniques d'ionisation beaucoup plus douces. Le GC/MS demeure l'outil par excellence pour le dosage urinaire ou plasmatique des acides organiques, acides gras, acides biliaires et stéroïdes.

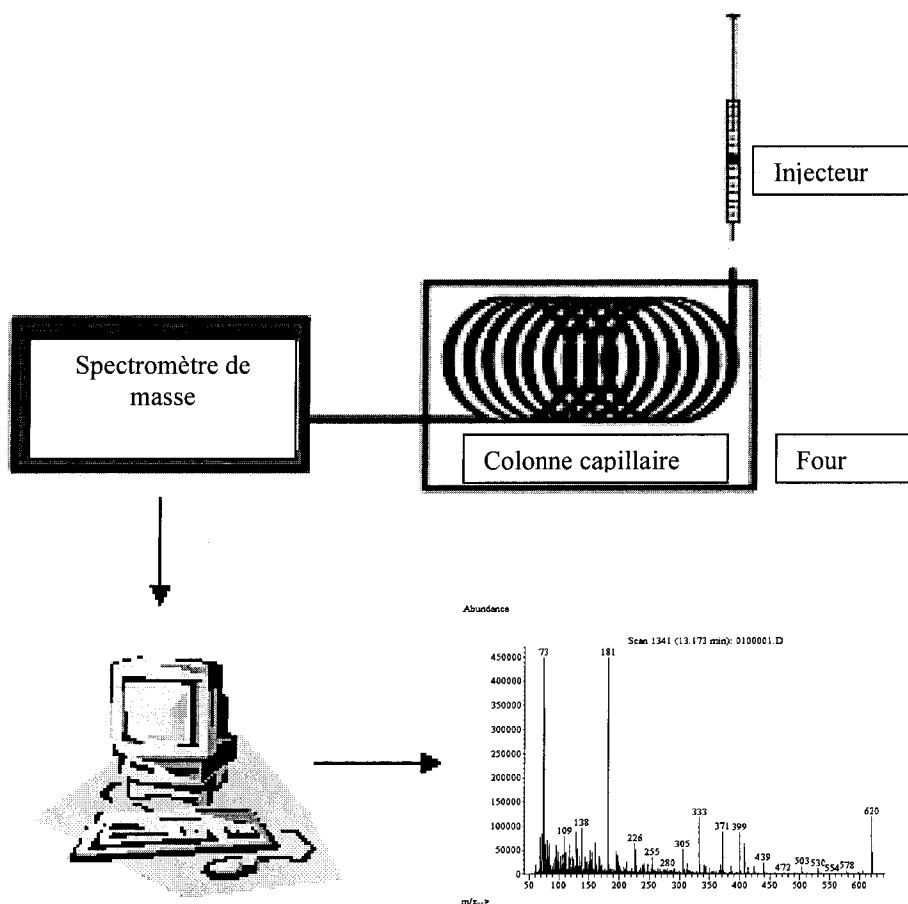


Figure 5. La schématisation d'un GC/MS. Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de mesurer le rapport m/z des ions formés à partir de l'échantillon analysé. Il est constitué des parties suivantes : **une source d'ions** dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse de l'échantillon à analyser, l'ionisation des molécules mais aussi la décomposition des ions, **un analyseur** qui permet de trier les ions en fonction de leur rapport m/z , **un détecteur** qui compte les ions en leur associant leur rapport m/z , **un enregistreur** pour le traitement du signal et la visualisation des spectres.

L'apparition du MS/MS a permis cependant d'effectuer ces dosages avec une spécificité analytique accrue et en une fraction du temps requis par le GC/MS. Cependant, cet instrument demeure encore difficilement accessible à cause de son coût élevé. Notons finalement que maintenant la spectrométrie de masse rend possible l'exécution d'analyses cliniques rapidement et d'une manière hautement spécifiques dans les domaines de la toxicologie, des immunosuppresseurs, de différents types de médicaments, des hormones et des protéines.

4. La mise au point de la méthode

Le SA est une petite molécule de poids moléculaire de 158 Da, comportant deux groupements cétones et une fonction carboxylique (figure 6). Le SA est un acide organique et la structure de ce type de molécule est composée de fonctions chimiques réactives. Afin d'éviter une transformation moléculaire au cours du processus analytique, on doit identifier ces sites réactifs et évaluer leurs degrés de réactivité au tout début du processus de mise au point de la méthode de dosage.

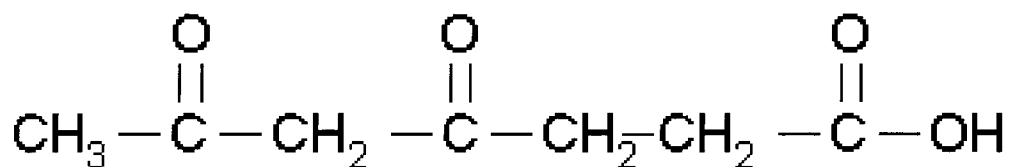


Figure 6. La structure chimique du SA (acide 4,6-dioxoheptanoïque)

Dès le départ, il est important de comprendre les principes et la théorie sous-jacents à la chromatographie en phase gazeuse. Les liquides biologiques ne pouvant être injectés directement, nous devons extraire au préalable le métabolite de ces derniers : c'est l'étape dite d'**extraction**. Il faut cependant anticiper une possible tautomérisation d'un groupement cétone lors de l'extraction. Ces fonctions devront être protégées : c'est l'étape dite d'**oximation**. Finalement, la polarité d'une fonction carboxylique doit être neutralisée avant l'introduction de la molécule dans le GC : c'est ce que l'on nomme la **dérivation** pré-injection.

4.1 Le principe d'extraction

Deux techniques d'extraction sont principalement utilisées pour la récupération des acides organiques dans les liquides biologiques. La première technique fait appel à une méthode d'extraction utilisant une phase solide contenue dans une petite colonne, celle-ci retiendra la molécule à isoler contenue dans le liquide biologique à analyser. Une solution de lavage sera ensuite utilisée pour débarrasser la phase stationnaire des métabolites indésirables et, finalement, une solution d'élution viendra recueillir la molécule d'intérêt. On nomme cette technique « extraction sur phase solide » (SPE). La deuxième technique se nomme « extraction liquide-liquide » et est réalisée par le contact intime d'un solvant organique avec le liquide biologique contenant l'analyte. Ce dernier passera du liquide biologique au solvant organique suite à un phénomène physique utilisant les différences de solubilité mutuelle de certains liquides et l'affinité de l'analyte pour la phase plutôt que

pour la phase aqueuse. La séparation des phases s'obtient par décantation ou centrifugation et l'évaporation du solvant organique nous permettra à la fois de récupérer et de concentrer le soluté. Aucune des deux méthodes d'extraction n'est efficace à 100% mais il a été démontré que le SA est isolé de façon comparable par l'une ou l'autre des deux méthodes (Tuchman et coll., 1984). Dans notre laboratoire nous avons choisi d'utiliser la deuxième méthode d'extraction soit l'extraction liquide-liquide pour sa simplicité et son efficacité comparable à la SPE.

4.2 L'oximation

Le SA contient deux groupements cétones qui, à cause de la présence d'hydrogène en position alpha sur les carbones adjacents, sont susceptibles de subir une tautomérisation céto-énol (figure 7). Il faut éviter cette réaction puisqu'il y aura perte d'intégrité de la molécule de SA suite à ce réarrangement moléculaire. Pour ce faire, les groupements cétones sont protégés par un processus d'oximation. L'oximation ajoute un groupement azoté en traitant les cétones avec un hydroxylamine, en l'occurrence, le O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBO) (figure 8).

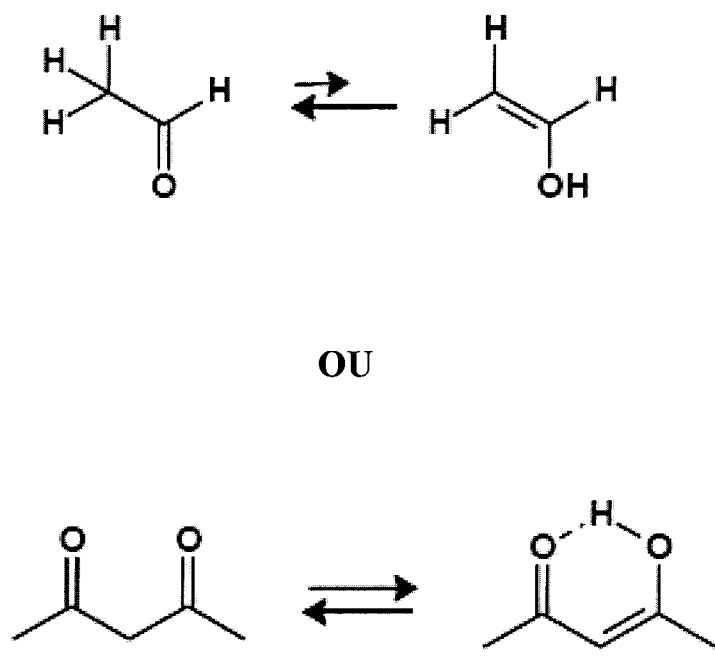


Figure 7. La tautomérisation céto-énol des groupements cétones et la stabilisation de la forme énol par une liaison hydrogène intramoléculaire.

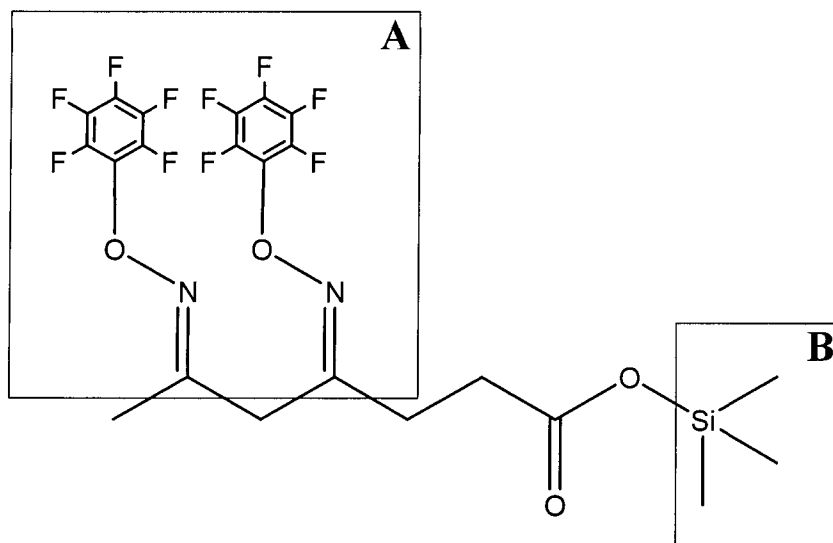


Figure 8. Les modifications moléculaires du SA suite à l'oximation (A) et à la triméthylsilylation (B)

4.3 La dérivation pré-injection

La colonne du GC étant non polaire, il est important de protéger le groupement polaire de notre molécule afin que celle-ci ne soit pas captée par la phase stationnaire ce qui l'empêcherait d'atteindre le spectromètre de masse. En dérivant le groupement hydroxyl du SA avec un composé triméthylsilyl (TMS), nous rendons ainsi la molécule

neutre, « plus volatile » et propice à son analyse par GC/MS. De plus, cette modification confèrera au SA une thermostabilité accrue diminuant ainsi le risque de dégradation lors de l'injection à 250 °C (figure 8).

4.4 L'utilisation de l'isotope stable

Toute méthode de quantification nécessite l'utilisation d'un standard interne qui permet de réajuster mathématiquement lors de la quantification les différentes fluctuations du processus technique. La variabilité de certains paramètres analytiques ou d'éventuelles erreurs de manipulation seront alors normalisées. L'incorporation dans l'échantillon d'un standard interne permet de maintenir la précision et l'exactitude analytique du dosage. En utilisant comme standard interne un composé chimiquement ou structuralement « similaire » **mais non identique** à la molécule à doser, nous introduisons différentes erreurs de récupération dues à des caractéristiques chromatographiques différentes d'une molécule à l'autre et à une efficacité d'ionisation pouvant aussi varier en fonction de la structure de la molécule (Mamer, 1996). En utilisant une molécule analogue à celle à doser marquée avec un isotope stable (^{13}C ou ^2H), nous évitons ces problèmes. De plus, par un effet d'entraînement lors de l'extraction liquide-liquide, il y aura une meilleur récupération de la molécule d'intérêt. Le standard interne isotopique, en excès dans la solution de départ par rapport à son analogue naturel, « entraînera » avec lui ce dernier à cause de leur ressemblance (Giovannini et coll., 1991). L'analyte et son standard interne sont virtuellement non distinguables chimiquement, chromatographiquement et dans leur processus d'ionisation mais peuvent être quantifiés séparément grâce au spectre de masse.

En utilisant le $^{13}\text{C5-SA}$ comme standard interne, ajouté au tout début du protocole analytique, notre technique peut être considérée comme une méthode de dosage par spectrométrie de masse utilisant la dilution à l'isotope stable et, suite à sa validation, être considérée comme une méthode de référence (Giovannini et coll., 1991).

5. Les critères de validation d'une méthode analytique

Il est important ici de différencier la validité analytique de la validité clinique. La validation analytique fait référence à l'évaluation de différents paramètres tels : l'exactitude, la précision, la sensibilité et la spécificité analytique. Une méthode analytique qui répond aux critères évaluant ces paramètres de validation démontre sa capacité à mesurer, déceler et identifier le métabolite pour lequel elle a été conçue. La validité clinique pour sa part fait référence à la précision avec laquelle la méthode analytique permet de diagnostiquer une maladie et est reliée à la sensibilité et à la spécificité clinique. Un test peut démontrer une forte sensibilité analytique (décèle toute présence du marqueur biochimique) mais une sensibilité clinique faible (un taux anormal du marqueur biochimique est observé chez 70% des personnes atteintes par exemple).

Les tests biochimiques effectués dans un laboratoire de génétique biochimique sont des actes qui s'inscrivent dans une démarche diagnostique ou thérapeutique. Ces actes incluent la validation analytique des méthodes, l'exécution d'analyses, les tests de contrôle et l'interprétation de résultats. Les critères de validation d'une méthode analytique suivent des règles établies dans le domaine de la chimie analytique et font l'objet de plusieurs

ouvrages de références (Hubert et coll., 2003 ; Ellerbe et coll., 1999; Thompson et coll., 2002). La validation permet d'étudier et de caractériser les performances analytiques des méthodes. Elle atteste qu'une méthode de dosage convient à l'exécution d'une certaine tâche à condition de tenir compte des limites révèle. Généralement, la validation complète d'une méthode quantitative doit couvrir les critères suivants : la spécificité, la précision et la justesse analytique (récupération). Les limites de quantification et de détection, la stabilité du métabolite, la linéarité de la courbe d'étalonnage. La spécificité représente l'absence d'interférence entre l'analyte et les composés de la matrice et/ou produits de dégradation. La récupération évalue la justesse de la méthode en déterminant la quantité de l'analyte dans un échantillon où une quantité connue fut introduite. La limite de quantification est la concentration en analyte qui peut être dosée quantitativement avec justesse et précision. La limite de détection définit la quantité minimale détectable mais non quantifiable. La stabilité du métabolite doit être évaluée en soumettant celui-ci à différentes conditions d'entreposage et de température échelonnées sur une période de temps simulant des conditions extrêmes. La linéarité est la capacité de la méthode à générer des résultats de mesure dans une certaine plage de concentrations et, finalement, la précision évalue la répétabilité de l'essai qui est calculée par les coefficients de variations intra essai et inter essai. Ces derniers consistent à vérifier la précision d'un dosage suite à de multiples injections du même échantillons au cours d'une même séquence d'analyse (intra-essai) et ensuite dans des séquences d'analyses différentes échelonnées sur plusieurs jours (inter-essai).

6. Les objectifs du projet

La méthode de Jakobs et coll., 1988 comporte plusieurs lacunes analytiques majeures. D'abord, elle ne répond pas aux critères d'analyses par dilution à l'isotope stable, règle élémentaire de nos jours en spectrométrie de masse. La démonstration de la validation analytique est absente et le protocole technique est très laborieux. L'atteinte de nos objectifs cliniques mentionnés plus loin doit donc passer obligatoirement par l'amélioration et le rehaussement des techniques existantes.

Le processus de développement d'un essai quantitatif par spectrométrie de masse est accompli suite à l'atteinte d'objectifs précis : (1) tester et statuer sur la meilleure source d'ionisation possible disponible dans notre laboratoire (LC/MS versus GC/MS); (2) examiner les spectres de masse et faire un choix des meilleurs ions à utiliser pour la quantification; (3) optimiser l'extraction et la purification de l'échantillon; (4) établir les paramètres chromatographiques et d'introduction de l'échantillon dans le GC; (5) choisir un standard interne adéquat; (6) optimiser la sensibilité de l'appareil afin de répondre aux besoins de l'analyse; (7) établir la courbe d'étalonnage; (8) valider la méthode.

Le but ultime de la mise au point d'une méthode éprouvée de dosage du SA est de pouvoir en faire bénéficier les cliniciens et les patients atteints de TH1. Ce nouveau test offert par le laboratoire de génétique biochimique permettra d'effectuer un test prénatal analytiquement précis et rapide basé sur le dosage d'un marqueur biochimique spécifique. À notre connaissance, aucune autre étude scientifique n'a montré la baisse du SA

plasmatique chez les patients traités au NTBC à des concentrations au-dessous de 1 $\mu\text{mol/L}$. L'établissement d'une méthode directe, d'une grande sensibilité et spécificité analytique pour le dosage du SA est le but ultime du projet. Cette technique est un atout important pour le diagnostic ou la confirmation d'un diagnostic pré ou postnatal ainsi que pour le suivi de la réponse pharmacologique au traitement.

RÉSULTATS

L'ARTICLE:

« La validation d'une méthode de dosage du succinylacétone par GC/MS et la quantification dans le liquide amniotique et le plasma de l'ordre du nanomolaire : un outil analytique pour la tyrosinémie héréditaire de type I »

AUTEURE ET AUTEURS :

Denis CYR, Robert GIGUÈRE, Gaëlle VILLAIN, Bernard LEMIEUX et Régen DROUIN

MON IMPLICATION DANS LE TRAVAIL :

Afin de réaliser l'objectif global proposé par mon directeur de recherche, le Dr Régen Drouin, de mettre au point un test biochimique pour le dosage du succinylacétone par GC/MS, j'ai conçu l'ensemble du projet de façon autonome. J'ai d'abord évalué les différentes façons de faire et fixé les objectifs spécifiques à atteindre. J'ai préparé les protocoles expérimentaux et j'ai ensuite effectué toutes les expériences nécessaires pour la mise au point de la méthode. En supervisant une étudiante stagiaire, M^{lle} Gaëlle Villain, j'ai bénéficié d'une aide technique de 8 semaines pour la validation de la méthode. J'ai effectué les essais cliniques et analysé les résultats décrits dans cet article. Finalement, j'ai rédigé l'article au complet. Monsieur Robert Giguère et les docteurs Bernard Lemieux et Régen Drouin ont supervisé les différentes étapes de mon projet.

**A GC/MS validated method for the nanomolar
range determination of succinylacetone in
amniotic fluid and plasma : an analytical tool for
tyrosinemia type I.**

Denis Cyr ^a, Robert Giguère ^a, Gaëlle Villain ^b, Bernard Lemieux ^a
and Régen Drouin ^a

^a *Service of Genetics, Department of Paediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4.*

^b *Department of Biology, Science and Technologies University, Lille, France.*

Submitted to: **Journal of Chromatography B**

Editors:

R. Bischoff, G. Hopfgartner, H.T. Karnes, W. Lindner, D.K. Lloyd

P.O. Box 681, 1000 Ar Amsterdam

The Netherlands

E-mail: chrom-eo@elsevier.com

Running title : A GC/MS validated method for the determination of succinylacetone

Keywords : Tyrosinemia, GC/MS, succinylacetone, NTBC,

Corresponding author :

Address :

Dr. Régen Drouin

Service of Genetics,

Department of Paediatrics

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke,

3001, 12th Avenue North

Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

Tel: (819) 820-6827

Fax: (819) 564-5217

E-mail: regen.drouin@usherbrooke.ca

Abstract :

A sensitive and accurate stable isotope dilution GC/MS assay was developed and validated for the quantification of succinylacetone (SA) in plasma and amniotic fluid (AF). SA is pathognomonic for tyrosinemia type I, a genetic disorder caused by a reduced activity of fumarylacetoacetate hydrolase. In untreated patients, SA can easily be measured in plasma and urine because the expected concentrations are in the $\mu\text{mol/L}$ range. Due to a founder effect, the province of Quebec has an unusually high prevalence of tyrosinemia type I, hence the quantification of SA in AF or plasma of treated patients in the nmol/L range becomes very useful. The method utilizes $^{13}\text{C}_5\text{-SA}$ as an internal standard and a three-step sample treatment consisting of oximation, solvent extraction and TMCS derivatization. The assay was validated by recording the ion intensities of m/z 620 for SA and m/z 625 for ISTD in order to demonstrate the precision of measurements, the linearity of the method, limit of quantification and detection (LOQ and LOD), specificity, accuracy, as well as metabolite stability. Values for the intra-day assays ranged from 0.2 to 3.2 % while values for the inter-day assays ranged from 1.9 to 5.6 % confirming that the method has good precision. A calibration plot using SA detected by GC/MS gave excellent linearity with a correlation coefficient of 0.999 over the injected concentration range of 5 to 2000 nmol/L . LOQ and LOD were 3 and 1 nmol/L respectively. The usefulness of this method was demonstrated by SA quantification in an AF sample of an affected foetus and in plasma of patients treated with NTBC. The results demonstrate that this novel GC/MS method may be a valuable tool for metabolic evaluation and clinical use.

1-Introduction

Hereditary tyrosinemia type I (HT1; McKusick 27670) is an autosomal recessive disorder caused by a deficiency in fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) in the tyrosine degradation pathway [1] (Figure 1). This inborn error of metabolism can cause severe liver disease and renal tubular dysfunction [2-3]. Whereas this deficiency is relatively rare in other regions of the world, it is frequently encountered in the province of Quebec due to a founder effect [4]. The FAH deficiency leads to an increase in the release of two toxic molecules: fumarylacetoacetate (FAA) and maleylacetoacetate (MAA) which are readily converted to succinylacetone (SA). This specific biomarker was identified in 1977 in urine of patients with HT1 [5]. Historically, the determination of tyrosine in plasma or on dried blood spots has been the primary biochemical test for the diagnosis of HT1. However, it is now well known that tyrosine levels can increase as a result of dietary changes [6] or a benign transient tyrosinemia [7] in the newborn and thus generate false-positives, thereby rendering tyrosine measurement as a non-specific test for the diagnosis of HT1. Currently, the diagnosis of HT1 relies entirely on the demonstration of increased levels of SA accompanied by a deficiency in FAH. Up until the early eighties, treatment of this disease was solely based on a restricted diet of phenylalanine and tyrosine, followed by a liver transplant as a second alternative. In 1992, a potent inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, namely 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), was found applicable to HT1 patients [8]. Treatment with NTBC has now become the mainstay for the management of HT1 and provides significant improvement of symptoms in patients [8-9] by drastically reducing the levels of FAA, MAA and SA in biological fluids.

In untreated patients, SA can easily be measured in plasma or urine because expected concentrations are in the $\mu\text{mol/L}$ range. Some well-established methods are used to diagnose the disease, most of which rely either on GC/MS, GC/MS/MS, capillary electrophoresis (CE) or tandem mass spectrometry (MS/MS) for direct quantification of SA [10-17] or are based on inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase [18]. However, NTBC administration treatment reduces the levels of SA to near the normal range after only a few weeks, hence the majority of current, published methods do not offer sufficient sensitivity or have not been designed for measuring SA levels in healthy individuals or at the basal range. To our knowledge, there are no reported methods using stable isotope dilution mass spectrometry that have been validated and that have demonstrated the sensitivity and capability of providing a biochemical follow up for HT1 patients under NTBC treatment. Such a method would allow to efficiently monitor the pharmacological response to NTBC by plasma SA analysis prior to and in the subsequent weeks after initiation of therapeutic treatment.

The current report presents a validated isotope dilution mass spectrometry method for measuring SA whilst demonstrating its application in the pre and postnatal diagnosis of HT1 as well, and its importance for monitoring SA in treated patients.

2-Methodology and design

2.1. Chemicals and reagents

Succinylacetone (4-6-dioxoheptanoic acid) and O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (PFBHA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA); $^{13}\text{C}5$ -succinylacetone ($^{13}\text{C}5$ -SA stable isotope internal standard) from Cambridge Isotope Laboratories (MA, USA); N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA) from Regis Technologies, Morton Grove (IL, USA) and chromatographic grade ethyl acetate and diethyl ether from Fisher Scientific (Ontario, Canada).

Stock solutions of SA (125 $\mu\text{mol/L}$) and $^{13}\text{C}5$ -SA (30 mmol/L) were prepared in water and stored at -80°C . Working solutions (50 nmol/L and 100 nmol/L , respectively) were obtained from stock solutions by dilution, kept at -80°C and discarded after 1 month.

2.2. Sample extraction and derivatization

Fresh SA standard solutions (5, 25 and 50 nmol/L) were prepared daily by appropriate dilution of the working solution. To 1 ml of standard, amniotic fluid (AF) or 0.5 ml of plasma (brought up to 1 ml with deionized water), 50 μl of $^{13}\text{C}5$ -SA (100 nmol/L solution) internal standard was added plus 40 μl of H_2SO_4 0.25 mol/L and 100 μl PFBHA (50 mg/ml) in order to perform oximation for 60 min at room temperature [19, 20]. Thereafter, pH was adjusted to 1 by adding 40 μl of 5 mol/L HCL to each tube saturated with 0.1 g of sodium chloride. The acidified sample was successively extracted with twice 2-mL of ethyl acetate and twice 2-ml of diethyl ether with vigorous shaking. The organic layers were combined into a second tube and the

solvent was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The residue was then derivatized with 100 μ l of BSTFA and heated for 60 min at 70°C [21]. Four microlitres of each sample were injected into the GC/MS system.

2.3. GC/MS analysis

An Agilent GC-MS system was used consisting of a 6890A model gas chromatograph and a 5973 model inert mass selective detector. A fused-silica capillary column coated with 5% phenyl-95% dimethylpolysiloxane (ZB-5, Phenomenex, 30 m 0.25 mm i.d., 0.25 mm film thickness) was also used. The GC temperature program was as follows: initial temperature was 80°C, held for 1 min, increased to 280°C at a rate of 17°C/min, held for 3 min. A splitless injection mode was used and 4 μ l were injected at 250°C, transfer line temperature at 270°C and ion source temperature at 200°C. The mass spectrometer was operated at 70 eV in the electron impact mode with selected ion monitoring (SIM). The selected ion groups for identification of SA and $^{13}\text{C5}$ -SA in SIM mode were m/z 620 and m/z 625, respectively. Dwell time for each ion was set at 100 ms.

2.4. Method validation

2.4.1 Molecule stability

The GC/MS method was validated for the quantification of SA by first investigating molecule stability. Thirty nmol/L SA samples were stored at room temperature, 4°C, -20°C and -80°C over an 8-week period allowing sufficient time to monitor stability. Samples were analyzed immediately after preparation (time zero), with SA determination performed every week for the selected period.

2.4.2 Recovery and assay precision

The recovery of SA was determined by assaying AF samples spiked with known concentrations of SA (5, 25 and 50 nmol/L). Accuracy assays were performed by evaluating the average coefficient of recovery (%), $[\text{experimental value}]/[\text{true value}] \times 100$. Precision was evaluated both intra- and inter-day by analysis of an AF sample fortified with known concentrations of SA (5, 25 and 50 nmol/L) and the data compared after three consecutive runs (intra-day) and from data obtained over a 3-day period (inter-day). Hence, the calculated %CV for both intra- and inter-day assays provides a reliable estimate for the reproducibility and intermediate precision of the method.

2.4.3 Linearity, limit of detection and quantification

Linearity was verified by analyzing standard samples in the 5 to 2000 nmol/L concentration range. The limit of detection (LOD) was calculated as the concentration producing a peak with a signal-to-noise ratio of at least 3:1 and the limit of quantification (LOQ) was calculated as the minimum concentration added to a blank sample that can be measured within 20% of the target concentration.

2.5. Samples

Two AF specimens from at risk pregnancies for HT1 and positive for SA were performed at 17 and 29 weeks of gestation and were provided by the Quebec Blood Neonatal Screening Program, Laval University Medical Center, Quebec, Canada. Thirty anonymised AF samples (13 to 18 weeks of gestation) obtained in our service of medical genetics served as controls. Plasma

from HT1 patients pre- and under NTBC treatment were received in our laboratory for amino acid analysis as part of a follow-up procedure for these patients. For controls, thirty anonymised plasma samples from patients referred for biochemical metabolic investigation in our laboratory were used and in which no abnormalities were found.

3. Results and discussion

3.1. Sample treatments and chromatography

In mass spectrometry, the use of compensating standards is essential for maintaining precision and accuracy. The stable isotope dilution technique is the method of choice and refers to the use of a stable isotope-substituted analogue of analyte as an internal standard, added to the sample at the very beginning of the analytical method [22]. To prevent the possible exchange of deuterium and hydrogen atoms between SA and deuterated-SA in the acid medium during the oximation step, the commercially available $^{13}\text{C5}$ -SA was chosen as our stable internal standard isotope. Since it can be added at the very outset of sample preparation, the assay thus becomes a true isotope dilution mass spectrometry reference method. There are currently no published techniques for the measurement of SA in plasma or AF in the nanomolar range that conform to these criteria. Keto acids such as succinylacetone, which contain an α -hydrogen atom on a carbon adjacent to the keto group, are subject to keto-enol tautomerism and therefore, in order to protect α -ketoacids in preparation, the carbonyl group must be converted to oxime-, methoxime- or ethoxime-derivatives prior to extraction [23-24]. In the present study, PFBHA was used to oximate SA, since this reagent offers high molecule stability. Moreover, no intra-molecular reaction can occur during oximation, in contrast to a likelihood of it occurring if hydroxylamine is used [10]. Very few methods have been used to extract SA from biological fluids prior to GC/MS analysis: one method requires a relatively long time span, while necessitating lyophilization and a liquid partition chromatography technique [13], whereas the others are based on liquid-liquid extraction [12,23, 25]. Solvent extraction, on the other hand, is simple and we

were able to confirm the efficiency of this known method [10, 26] by comparing, in a triplicate assay, the peak areas of SA standards obtained after solvent extraction with those obtained after evaporation of pure oximated standards prepared in methanol (unextracted standards). The mean efficiency of extraction compared to the unextracted sample was 76% (data not shown).

Following extraction, SA was derivatized by trimethylsilylation (TMS), this method being useful in the analysis of volatile organic acids by making them less volatile, more thermally stable and suitable for GC/MS analysis. As a result, GC separation is improved and detection is enhanced. Two different silylation reagents were used, namely BSTFA and BSTFA+10% trimethylchlorosilane (TMCS), where BSTFA alone provided a slight improvement in overall signal to noise ratio.

Figure 2 presents a typical chromatogram of SIM analysis of a standard sample. An HT1 plasma sample compared to a normal plasma sample, as well as an HT1 patient under NTBC treatment for the past 3 months are shown in Figure 3. SA was converted into four different derivatives when treated with PFBHA. Following trimethylsilylation, the four isomers corresponding to two cis and two trans chemical configurations were separated by capillary GC yielding a specific chromatographic pattern that improved assay specificity. In addition to targeting the molecular weight $[M+H]^+$ m/z 620 for SA, this chromatographic profile must be present to confirm molecular identity. In order to establish the standard curve and sample quantifications, the ion abundance of the three predominant isomers were used. At low concentrations, the first isomer with a retention time at 13.05 min., corresponding to the less favorable geometric isomerism, was nearly undetectable. Thus, only the three major isomer peaks of SA and $^{13}C5$ -SA were considered for quantification.

Figure 4 illustrates the mass spectra of SA dioxime tri-TMS obtained by GC/MS (scan analysis). The mass spectrum is characterized by the m/z 620 ion (molecular ion) and by ions 181 and 73, which are assigned to PFBHA and TMCS respectively.

3.2. Method validation

Because it is often necessary to store samples for an extended period of time prior to analysis or to provide advice for shipment storage, the evaluation of the stability of SA was therefore determined. Several investigators have previously reported that SA is unstable [23, 27], correlating with our results. The stability of SA was evaluated under four different conditions (room temperature (RT), 4°C, -20°C and -80°C) over an 8-week period. Aqueous standard samples were analyzed immediately after preparation (reference values) and after storage. Our results suggest that SA must be kept at -80°C in order to maintain complete integrity for storage for 8 weeks. At 4°C and -20°C, mean recoveries were 70% after a 3-week storage period and remained stable for the rest of the study. At RT, SA was drastically degraded resulting in only 18% recovery after 8 weeks of storage.

The mean overall coefficient of SA recovery (%) from an AF spiked with 5, 25 and 50 nmol/L of SA using the liquid-liquid extraction and recalculated with a standard curve established with the same procedure was 95.7% (see Table 1) which was well within the 85 – 115% range normally used as a criterion in method validation. In the current method, LOD and LOQ were 1 and 3 nmol/L respectively. To verify these parameters, 5 nmol/L SA was used as

the lowest calibration point on every analytical run as well as verify that the signal-to-noise ratio was at least five times greater than any interference.

A calibration plot using SA detected by GC/MS gave excellent linearity with a correlation coefficient of 0.999 for the three major isomer peaks over the injected concentration range of 5 to 2000 nmol/L. Intra-day and inter-day precision of mass spectrometry detection were evaluated by analyzing control samples spiked with SA (5, 25 and 50 nmol/L) (see results in Table 1).

In addition to accuracy, precision was used to assess the suitability of the method whereby the calculated coefficient of variation (%CV) values should not exceed 15%. Values for the intra-day assays ranged from 0.2 to 3.2 % while values for the inter-day assays ranged from 1.9 to 5.6 % confirming that the method has good precision.

3.3. Clinical applications

The present method was applied to determine both AF and plasma concentrations of SA for the purpose of prenatal diagnosis, as well as the pharmacological response in the follow up of an HT1 patient under NTBC treatment, respectively. To date, this novel method has been successfully applied to the analysis of over 300 AF and 60 plasma samples where statistical data are shown in Table 2. The sensitivity needed to achieve an unambiguous prenatal diagnosis exceeded several orders of magnitude in this study and is demonstrated in Figure 5. Initially, the present method was developed to perform a HT1 prenatal test in our biochemical genetics laboratory, but its high sensitivity and specificity enabled to further extend this method to the

study of HT1 disease and its treatment with NTBC. HT1 is a disease frequently encountered in the province of Quebec, for which there are no published data providing SA plasma concentrations in order to monitor HT1 patients, prior to NTBC treatment (at time of diagnosis) and several weeks thereafter, until the concentration reaches a plateau at about 6 S.D. above normal. Also, during this study, we periodically received plasma samples from a newly-diagnosed HT1 patient through the Quebec Blood Neonatal Screening Program. The samples were received 2 days following initiation of treatment. Figure 6 provides a pharmacological response curve established for this patient using the assay method described herein.

4. Conclusion

The method developed herein is both useful and reliable not only for prenatal diagnosis and pharmacological response studies but can also be applied as a confirmatory test for the indirect quantification of SA based on inhibition of δ -aminolevulinate dehydratase used in mass screening. The signal-to-noise ratio and the robustness of the quantification have been enhanced by a new analyzer equipped with an ionization source coated with an inert material and a turbo molecular pump enabling to raise the vacuum. The most important advantages of the present GC/MS for AF and plasma SA are its relative simplicity in sample preparation, the fact that it is a validated method respecting all criteria related to a stable isotope dilution procedure, its capability to monitor the decrease in plasma SA following NTBC introduction, to values nearing the basal range and finally, that it requires less sophisticated and less expensive instrumentation compared with the use of tandem mass spectrometry.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Yves Giguère, Dr. Jean Ruel and Mr. André Grenier from the Quebec Blood Neonatal Screening Program, Laval University, Quebec City, Quebec Canada, for supplying amniotic fluid samples from affected fetuses. They are grateful to Dr. Grant Mitchell of the Hôpital Sainte-Justine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada for his full collaboration in the monitoring study. The authors sincerely thank Mrs. Christiane Auray-Blais for carefully editing the manuscript. The research carried out in the laboratory of R.D. was funded by the Canada Research Chairs Program. R.D. holds the Canada Research Chair in « Genetics, Mutagenesis and Cancer ».

References

- [1] M. St-Louis, R.M. Tanguay, *Hum. Mutat.* 9 (1997) 291.
- [2] P.A. Russo, G.A. Mitchell, R.M. Tanguay, *Pediatr. Dev. Pathol.* 4 (2001) 212.
- [3] E.A. Kvittingen, *J. Inherit. Metab. Dis.* 14 (1991) 554.
- [4] M. De Braekeleer, J. Larochelle, *Am. J. Hum. Genet.* 47 (1990) 302.
- [5] B. Lindblad, S. Lindstedt, G. Steen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (1977) 4641.
- [6] C.J. Hendriksz, J.H. Walter, *Acta Paediatr.* 93 (2004) 552.
- [7] D.N. Rice, I.B. Houston, I.C. Lyon, B.A. Macarthur, P.R. Mullins, A.M. Veale, R. Guthrie, *J. Inherit. Metab. Dis.* 12 (1989) 13.
- [8] S. Lindstedt, E. Holme, E.A. Lock, O. Hjalmarson, B. Strandvik, *Lancet* 340 (1992) 813.
- [9] N. André, B. Roquelaure, V. Jubin, C. Ovaert, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 103.
- [10] M. Tuchman, C.B. Whitley, M.L. Ramnaraine, L.D. Bowers, K.D. Fregien, W. Krivit, *J. Chromatogr. Sci.* 22 (1984) 211.
- [11] A.L. Shroads, G.N. Hendreson, J. Cheung, M.Q. James, P.W. stacpoole, *J. Chromatogr. B* 808 (2005) 153.
- [12] A. Kumps, E. Vamos, Y. Mardens, M. Abramowicz, J. Genin, *J. Inherit. Metab. Dis.* 27 (2004) 567.
- [13] C. Jakobs, L. Dorland, B. Wikkerink, R.M. Kok, A.P. de Jong, S.K. Wadman, *Clin. Chim. Acta* 171(1988) 223.
- [14] T. Hagen, M.S. Korson, M. Sakamoto, J.E. Evans, *Clin. Chim. Acta* 283(1999) 77.
- [15] M.S. Cansever, F.B. Erim, *J. Chromatogr. B* 818 (2005) 309.
- [16] M.S. Rashed, M.A.D Al- Sayed, Z. Rahbeeni, Z. Al-Hassnan, L. Al-Ahaidib, M. Luanaigh, M. Al-Amoudi, *J. Inherit. Metab. Dis.* 26 suppl. 2 (2003) 196.
- [17] M.S. Rashed, L.Y. Al-Ahaidib, O.Y. Al-Dirbashi, M. Al-Amoudi, M.M. Al-Sayed, Z. Rahbeeni, Z. Al-Hassnan, A. Al-Dbas, M. Al-Owain, M. Ni Luanaigh, *Anal. Biochem.* 339 (2005) 310.

- [18] A. Grenier, A. Lescault, in: H. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, (3rd ed.), Weinheim, Germany, 1985, p.73.
- [19] L. Sweetman, in: F.A. Hommes (Ed.), *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics : A Laboratory Manual*, Wiley-Liss, 1991, p.143
- [20] C.H. Deng, W. Zhang, J. Zhang, X.M. Zhang, *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 235.
- [21] R.A. Chalmers, A.M. Lawson, in: *Organic Acids in Man*, Chapman and Hall, London, 1982, p.27.
- [22] M. Sergeant, C. Harrington, R. Harte (Eds.), *Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS)*, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2002 , p.1
- [23] X. Fu, M. Kimura, M. Iga, S. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B* 758 (2001) 87.
- [24] R.A. Chalmers, A.M. Lawson, in: *Organic Acids in Man*, Chapman and Hall, London, 1982, p.12.
- [25] B.R. Petit, F. MacKenzie, G.S. King, *J. Inherit. Metab. Dis.* 7 Suppl. 2 (1984) 135.
- [26] R.M. Cohn, S. Updegrove, J.R. Yandrasitz, R. Rothman, K. Tomer, *Clin. Biochem.* 11 (1978) 126.
- [27] P. Allard, A. Grenier, M.S. Korson, T.H. Zytkevicz, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 1010.

LEGEND OF FIGURES

Figure 1. Pathway of tyrosine degradation and action of the therapeutic agent NTBC 2-(2 nitro- 4 trifluoromethylbenzoyl)-1,3 cyclohexadione)

Figure 2. GC/MS ion chromatogram of SIM analysis of four isomers of the SA derivatives (standard : 25 nmol/L, m/z 620) and their stable isotope analogue $^{13}\text{C}_5\text{-SA}$ (100 nmol/L, m/z 625) .

Figure 3. Comparative GC/MS chromatograms (SIM) of (A) an enlarged chromatogram portion of a normal plasma SA (12 nmol/L) compared to SA from an HT1 patient treated with NTBC for the past 3 months (37 nmol/L), and (B) an HT1 patient at the start of NTBC treatment (2 days, 4.8 $\mu\text{mol/L}$) compared with an healthy individual (12 nmol/L).

Figure 4. Mass spectra of succinylacetone dioxime-TMS.

Figure 5. Chromatogram obtained from amniotic fluid of an HT1 fetus (2012 nmol/L)

compared to a normal (4 nmol/L) fetus. The four SA isomers are shown (m/z 620).

For better chromatographic clarity, the m/z 625 from $^{13}\text{C}_5\text{-SA}$ was not extracted.

Figure 6. SA profile of plasma concentrations over in an HT1 patient following initiation of NTBC treatment.

Table 1 :

Table 1.

Precision and accuracy of the assay in amniotic fluid.

Amount added (nmol/L)	Mean (n=3) measured concentration (nmol/L)	Mean recovery (%)	Precision (n=3)	
			Intra-day (%CV)	inter-day (%CV)
0	4.6	NA ^a	NA	NA
5	9.3	97.2	3.2	5.6
25	29.1	98.5	0.2	2.3
50	50.4	92.4	1.7	1.9

^aNA, not applicable

Table 2 :

Table 2.

Plasma and amniotic fluid SA concentration in the control group and HT1 patients

Samples	SA concentration (range, SD), nmol/L
Amniotic fluid control (n=30) ^a	mean = 3 (0 – 13, 3)
Affected case 1	2102
Affected case 2	2012
Plasmas control (n=30) ^b	mean = 13 (3 - 21, 3.6)
HT1 treated patients (n=21) ^c	mean = 33 (21 - 55, 8)

^a 13 to 17 weeks of gestation^b All ages^c All patients are treated from at least 7.5 months, age average = 7 yr, range = 0.7 – 32 yr.

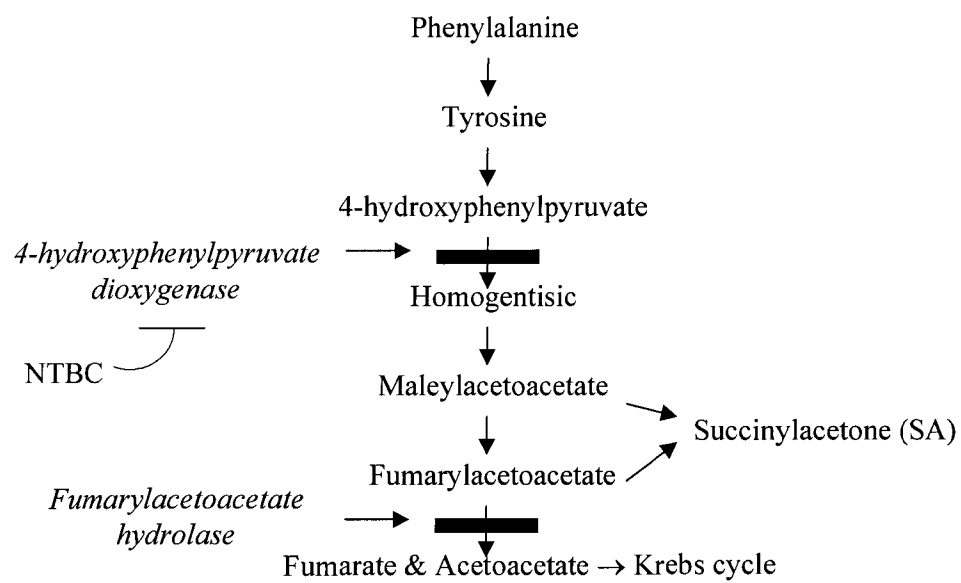
Figure 1 :

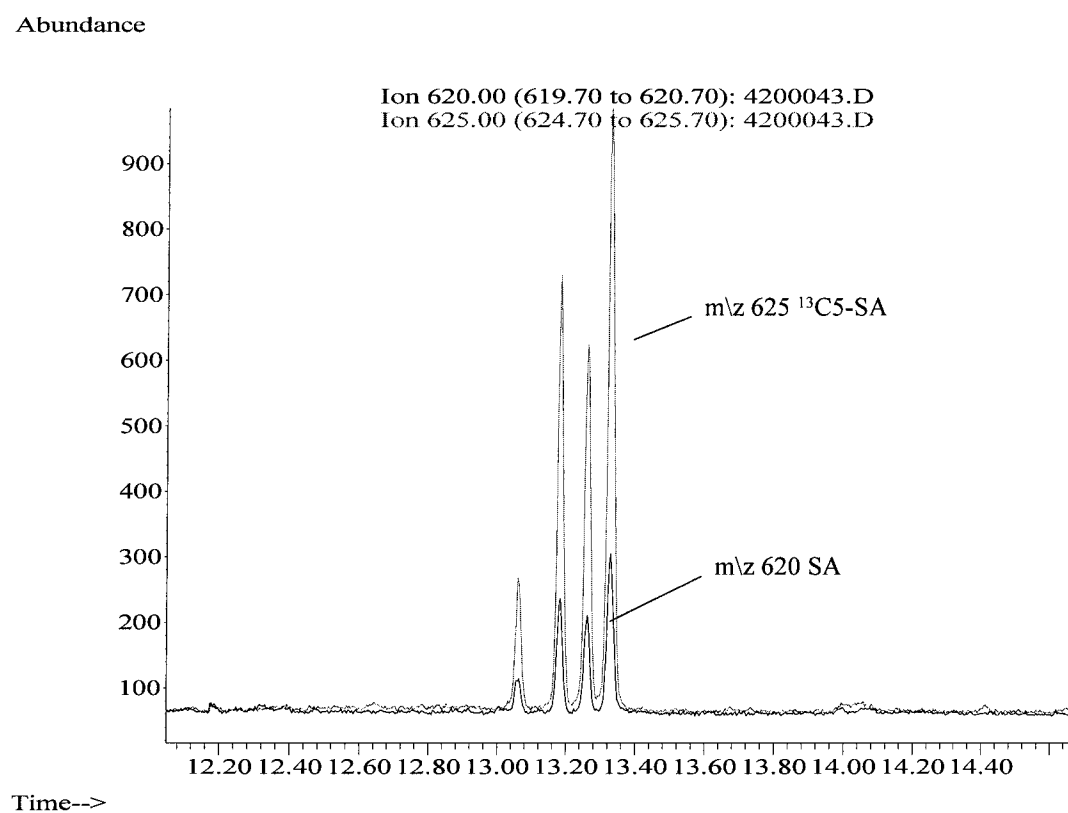
Figure 2 :

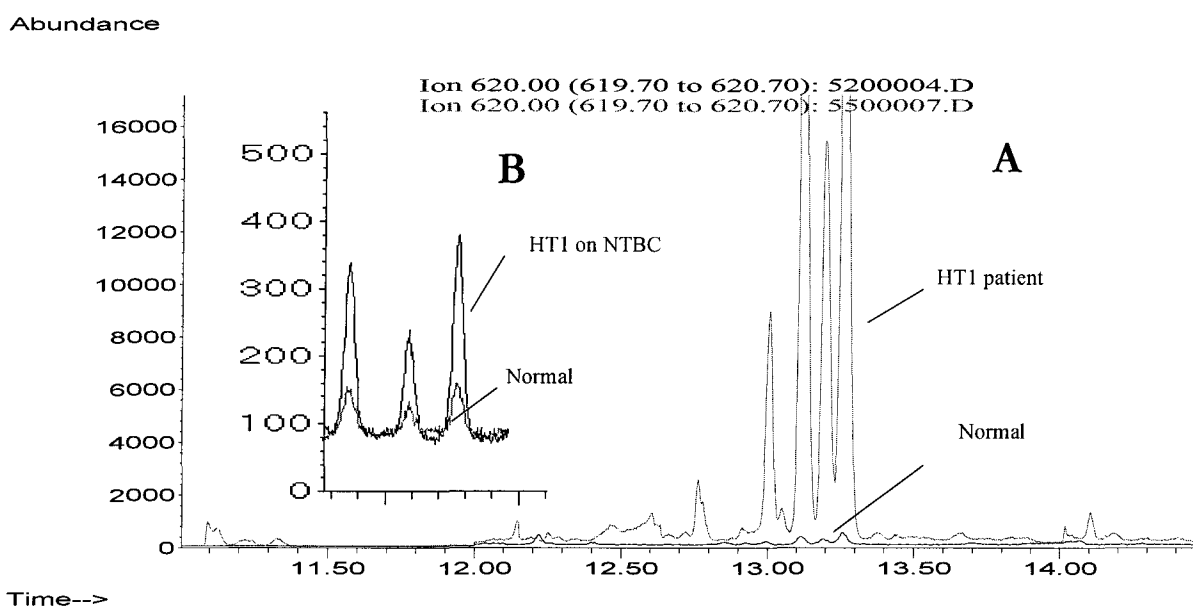
Figure 3 :

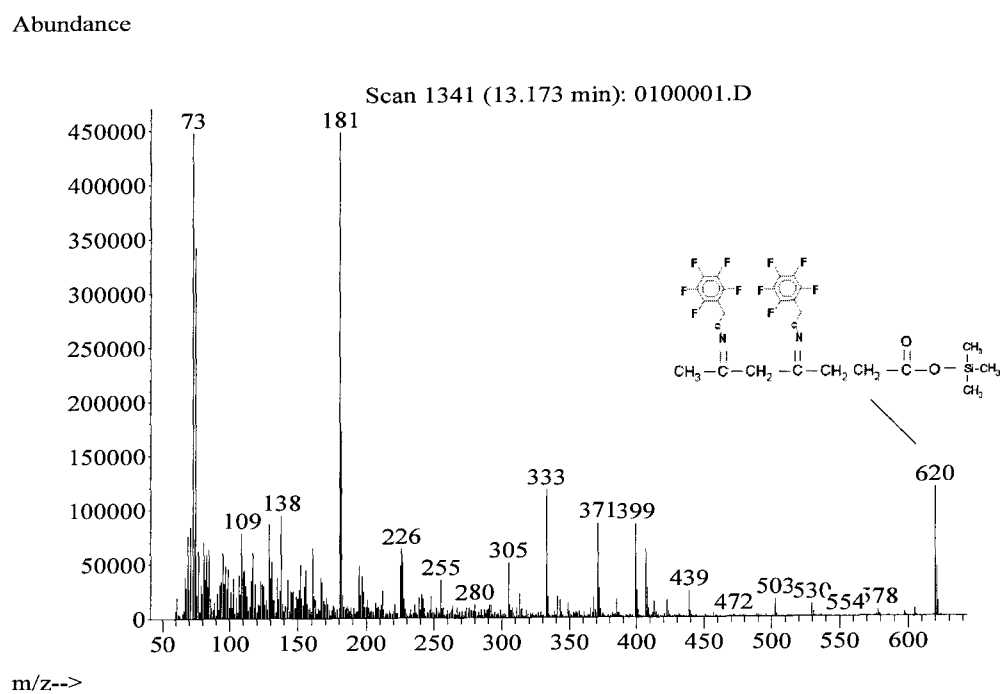
Figure 4 :

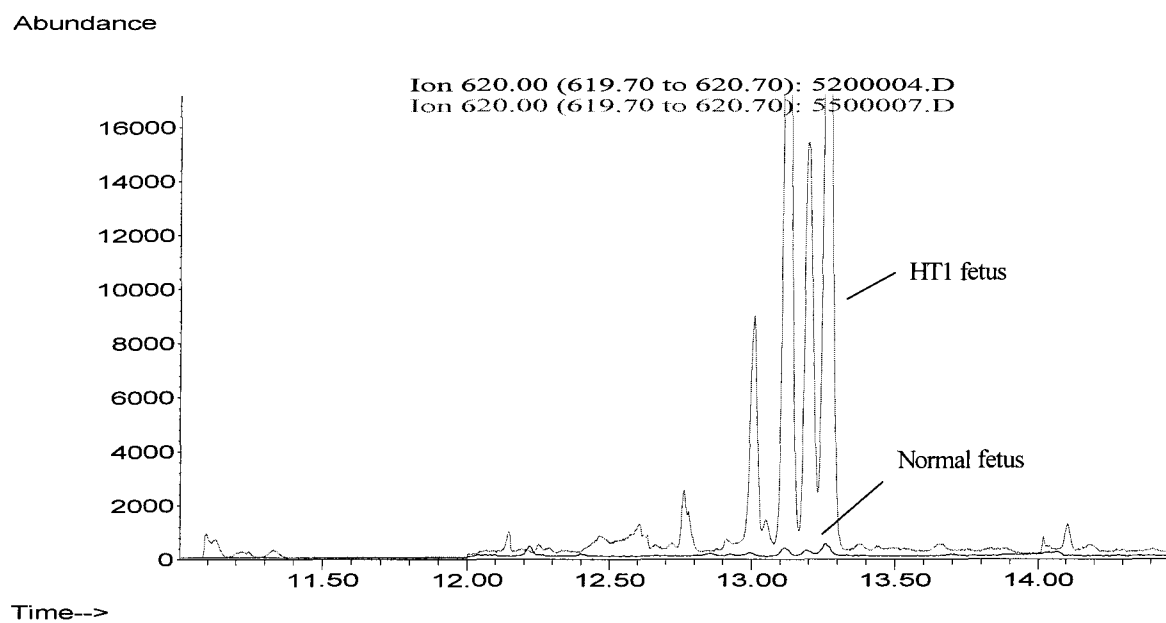
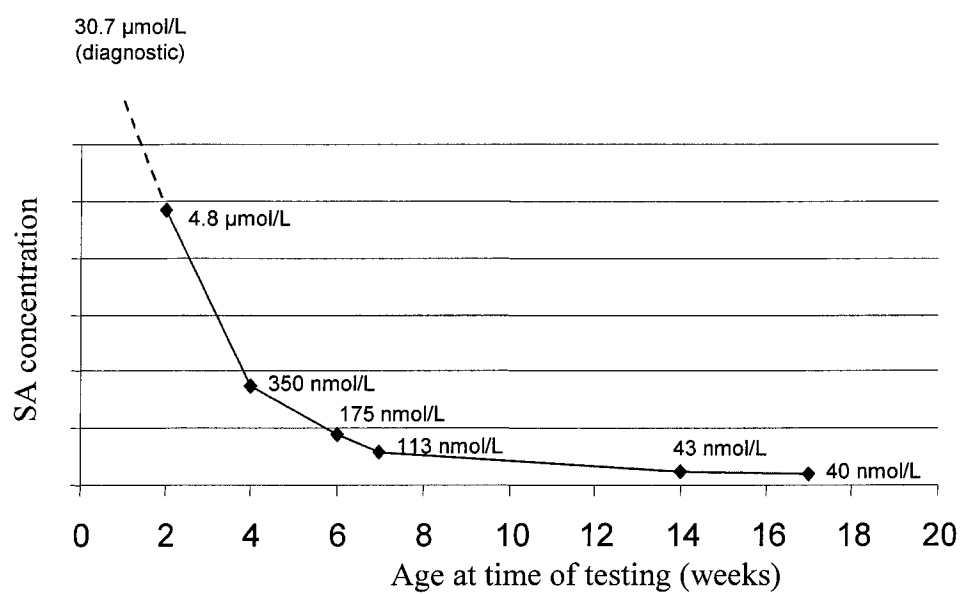
Figure 5 :

Figure 6 :

DISCUSSION et CONCLUSION

1. La justification de l'étude et l'atteinte des objectifs

Depuis la découverte de la présence de la TH1 au Québec en 1965, environ 160 cas ont été répertoriés. L'incidence élevée de TH1 au Québec, qui varie de 1/19 700 à un maximum de 1/1 846 plus particulièrement au SLSJ a comme conséquence le diagnostic de un a trois nouveaux cas chaque année selon la COrporation de Recherche et d'Action sur les Maladies Héréditaires (CORAMH) siégeant à Chicoutimi, province de Québec. Depuis l'implantation du dépistage néonatal l'incidence tend à diminuer au fil des ans. La détection des hétérozygotes, l'augmentation de l'immigration dans la région du SLSJ et l'amélioration du traitement sont directement reliées à ce phénomène. Le Québec demeure au prise avec un nombre élevé de patients sous traitement. Il est d'une importance primordiale d'avoir un outil diagnostique offrant une précision et une spécificité analytiques permettant non seulement le diagnostic pré et postnatal mais un suivi efficace des patients traités. Le SA est le marqueur biochimique qui a la plus grande spécificité clinique pour la TH1 (Rashed et coll., 2005). Son dosage par spectrométrie de masse est le meilleur moyen pour son identification et sa quantification. Le dosage de ce biomarqueur demeure la façon la plus simple et la plus rapide d'évaluer l'activité de la FAH. De plus, peu importe le traitement administré au patient atteint : diète faible en phénylalanine et en tyrosine, NTBC, transplantation hépatique ou, dans le futur, thérapie génique ou enzymothérapie, le dosage du SA restera une voie rapide d'évaluation du traitement. Nos objectifs étaient de mettre au point et de valider une méthode de dosage du SA par

spectrométrie de masse et, ensuite, d'en évaluer l'efficacité clinique. Nos résultats démontrent clairement le potentiel de cette technique pour le dépistage prénatal et postnatal et son efficacité pour la quantification du SA plasmatique suite à la réponse pharmacologique liée au traitement par le NTBC.

2. Les avantages et les désavantages des outils analytiques

Depuis la découverte de cette erreur innée du métabolisme, plusieurs tests diagnostiques ont été développés. Pour le diagnostic de la TH1, les méthodes diagnostiques successivement utilisées sont le dosage : (1) de la tyrosine (Grenier et Laberge, 1974), (2) de l'alpha-foetoprotéine (Grenier et coll., 1976) , (3) du SA par inhibition de l'enzyme ALA-D (Berger et coll., 1983), (4) du SA par spectrométrie de masse (Tuchman et coll., 1984 ; Jakobs et coll., 1988), (5) de la FAH (Laberge et coll., 1990) et (6) du SA par LC-MS/MS (Rashed et coll., 2005). Seules celles ciblant le SA sont encore aujourd'hui utilisés. Il a été tout d'abord clairement démontré que les dosages de la tyrosine et de l'alpha-foetoprotéine manquaient de spécificité clinique (Goulden et coll., 1987). D'autre part, la détermination du SA par inhibition de l'ALA-D est une méthode indirecte pouvant générer des résultats faussement positifs. Les causes de ces faux positifs peuvent être, une activité enzymatique variable, une inhibition de l'enzyme causée par une urine trop concentrée, la présence d'interférents tels le zinc ou le plomb et une coloration au réactif de Ehrlich's non spécifique (Grenier et Lescault, 1985). La mesure de l'activité de la FAH fut envisagée pour pallier à ces faiblesses mais cette technique impliqua aussi des limitations dont des

contaminations exogènes possibles provenant de tissus maternels ou par suite de transfusion sanguine, ou occasionné par la présence d'un gène pseudo-déficient (Pettit et coll., 1985)

Toutes les techniques de spectrométrie de masse publiées jusqu'à maintenant comportent des lacunes. L'amélioration de celles-ci motiva donc notre étude. Les principales lacunes sont les suivantes : (1) les méthodes de dosage par GC/MS sont laborieuses et la présence d'un standard interne adéquat (isotopique) est souvent déficiente ou mal utilisée ; (2) les méthodes existantes sont généralement validées de façon partielle ; (3) aucune ne répond à la fois aux critères de simplicité et de spécificité analytique en utilisant l'isotope stable dans le but d'optimiser l'exactitude et la précision analytique, tout en démontrant une validation rigoureuse et un monitoring du SA de l'ordre du nmol/L. L'arrivée récente du LC-MS/MS dans ce domaine est très prometteuse à cause de sa haute sensibilité analytique et de sa rapidité. Son emploi est réservé présentement qu'au diagnostic de la TH1 à partir de l'urine (Rashed et coll., 2005) et du sang séché sur papier filtre (Allard et coll., 2004). Ce dernier est cependant validé qu'à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{mol/L}$. Aucune étude de réponse pharmacologique n'a été publiée sur un suivi des taux plasmatiques de SA suite à l'administration du NTBC avec le LC/MS/MS en dosant aussi le SA chez des patients normaux. De plus, son coût élevé en fait un outil analytique peu accessible. Cependant, notre méthode comporte certaines contraintes mineures. D'abord, le temps requis pour une analyse complète nous permet guère d'effectuer plus de 36 tests / appareil / jour, ce qui la rend incompatible avec un dépistage de masse. De plus, pour conserver cette sensibilité (limite de détection = 3 nmol/L), tous

les paramètres analytiques doivent être maintenus dans des conditions optimales, entraînant ainsi un entretien et un suivi méticuleux de l'appareil.

Le dosage de marqueurs biochimiques, suite à l'utilisation du papier filtre comme support pour les prélèvements sanguins ou urinaires, demeure très avantageux dans le cadre d'un dépistage de masse ou pour l'envoi d'un échantillon dans un laboratoire spécialisé pour une évaluation diagnostique. Les méthodes de dosage du SA dans le sang séché sur papier filtre (Allard et coll., 2004) et de l'ALA dans l'urine séchée sur papier filtre (Shinka et coll., 2005) sont des méthodes mises au point et potentiellement très efficaces pour le diagnostic de la TH1. La méthode de Shinka est cependant laborieuse et non applicable à un dépistage de masse. Ces deux techniques récemment publiées n'ont cependant pas démontré leur efficacité dans le dosage du SA ou de l'ALA chez des patients traités au NTBC ou encore dans le LA pour le diagnostic prénatal. Les objectifs premiers de la méthode faisant l'objet du présent mémoire étaient justement de réussir à doser le SA dans le LA ainsi que dans le sang et l'urine de patients traités au NTBC. Évidemment notre méthode peut être utilisée à des fins diagnostiques mais d'autres techniques citées précédemment comportent certains avantages à cet égard, entre autre la simplicité et la rapidité du LC/MS/MS. Tel qu'observé par Shinka et ses collaborateurs, notre propre étude de stabilité du SA a démontré l'instabilité de cette molécule. Dans la situation qui nous intéresse, un avis de congélation des spécimens utilisés pour le dosage du SA dans le LA ou chez les patients traités au NTBC doit alors être diffusé et respecté. À la lueur des récentes publications, le test idéal de dépistage ou de diagnostic utilisant un prélèvement sur papier filtre serait-il le dosage de l'ALA par LC-MS/MS alliant sensibilité, rapidité, spécificité et stabilité du métabolite ?

3. La validation : démarche et interprétation

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est aujourd'hui largement répandu mais encore trop souvent mis de côté. Les différentes réglementations relatives aux bonnes pratiques de laboratoire ainsi que les documents de contrôle de la qualité (ISO, par exemple) suggèrent que toutes les procédures de dosage répondent à certains critères d'acceptabilité (Hubert et coll., 2003). Dans un souci de qualité, nous avons mis tous les efforts nécessaires pour valider notre méthode selon les règles de l'art. Nous avons établi que notre validation serait complète en répondant aux critères suivants : (1) l'exactitude analytique par des expériences de récupération, (2) la précision analytique en évaluant les coefficients de variation intra-essai et inter-essai, (3) la sensibilité analytique par l'évaluation de la courbe de calibration et le coefficient de corrélation, (4) les limites de quantification et de détection qui sont en relation étroite avec la sensibilité analytique et finalement, (5) la stabilité du métabolite à doser.

Le test de récupération détermine l'exactitude de l'essai. Cet exercice permet d'évaluer le coefficient de récupération en comparant des valeurs obtenues pour un échantillon dont nous avons ajouté une quantité connue de SA et la valeur vraie de l'échantillon. Le coefficient de récupération = $\frac{\text{valeur expérimentale}}{\text{valeur vraie}} \times 100$ et est de 95.7% pour notre méthode. Ce qui démontre l'exactitude élevée de notre technique aidée par l'utilisation d'un standard interne isotopique pouvant pallier avec précision à une extraction liquide-liquide connue pour son rendement variable. Avec des coefficients de variation intra-essai et inter-essai ne dépassant pas 6% (voir tableau 1, page 44), notre méthode démontre une répétabilité et une reproductibilité analytiques sous la

barre des 15% normalement utilisée en chimie analytique. La linéarité de l'essai, avec un coefficient de corrélation de 0.999 à des concentrations entre 5 et 2000 nmol/L, permet la quantification juste sur une plage très étendue de valeurs physiologiques normales et pathologiques. C'est un prérequis à l'estimation de l'exactitude et de l'intervalle analytique. Nous avons pu mesurer avec précision une quantité de 3 nmol/L de SA ajoutée à un LA, déterminant ainsi notre limite de quantification. Sous cette valeur, la quantification est accompagnée d'une variabilité de ± 1 nmol/L jusqu'à notre limite de détection, établie à 1 nmol/L. La limite de détection d'une procédure analytique est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée mais non quantifiée. Notre méthode ne peut donc mesurer exactement le SA à des concentration plus petites que 3 nmol/L (limite de quantification) mais ces concentrations n'ont aucune signification clinique et reflètent, de ce fait, un taux de SA quasi absent ou sous forme de « trace ».

La stabilité du SA, nous a permis de confirmer la dégradation substantielle du métabolite à des températures supérieures à -20°C . Nous nous sommes alors questionné sur l'imprécision d'un dosage du SA sur du sang séché sur papier filtre et entreposé à température ambiante plusieurs jours avant l'analyse. Cependant, les concentrations retrouvées chez les patients atteints de TH1 sont tellement élevées qu'une dégradation ne changera pas le résultat du dépistage. Le résultat quantitatif quant à lui, sera sans doute biaisé et imprécis et ce mode de prélèvement sur papier filtre serait inapproprié pour le suivi de patients traités.

4. L'application clinique

Cette méthode par GC/MS est maintenant utilisée dans notre laboratoire pour le dosage du SA dans le LA et le plasma. Nous avons établi nos propres valeurs de référence pour ces deux liquides biologiques (figures 9 et 10). Les taux plasmatiques du SA furent aussi déterminés chez 21 patients traités sous NTBC. Nos valeurs sont légèrement inférieures à celles rapportées par le groupe de Jakobs (Jakobs et coll., 1988) (la seule équipe qui, à notre connaissance, a publié des valeurs de référence plasmatiques pour le SA par GC/MS), notamment en ce qui a trait à la limite supérieure des valeurs de référence. Nos données plasmatiques révèlent une moyenne de 13 nmol/L avec un intervalle de 6 à 21 nmol/L, comparées à une moyenne de 44 nmol/L avec un intervalle de 5 à 163 nmol/L pour l'équipe de Jakobs. Les mêmes constatations furent notées pour le LA : moyenne de 3 nmol/L (intervalle : 0 – 13), contre une moyenne de 16 nmol/L (intervalle : 1 – 30) pour l'équipe de Jakobs. Ces différences peuvent être expliquées par une technologie moins performante à l'époque, l'utilisation d'un standard interne déjà oximé avant le début de l'analyse et un manque au niveau de la validation de la méthode. Tous ces facteurs ont pu affecter la l'exactitude de leurs résultats.

Succinylacéton dans le liquide amniotique

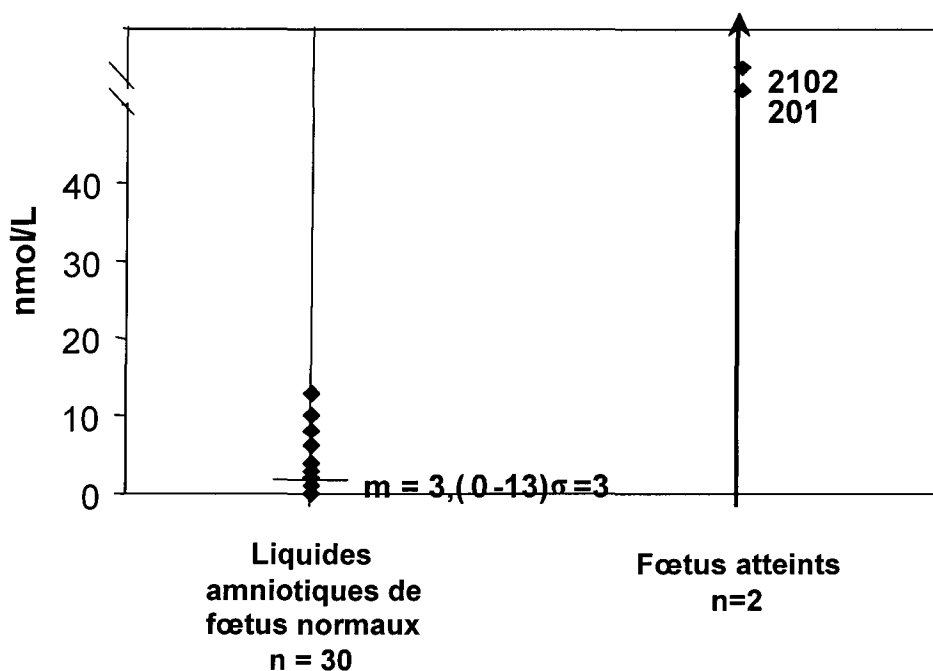


Figure 9. Les valeurs de référence du SA dans le LA de fœtus normaux versus fœtus atteints.

Nous avons aussi appliqué notre technique au dosage du SA urinaire. Cependant nos résultats furent moins concluants, principalement attribuables à une chromatographie beaucoup plus difficile à interpréter. L'urine est un milieu biologique contenant un grand nombre de molécules issues du catabolisme. C'est aussi le liquide d'excrétion privilégié pour les métabolites exogènes issues de l'alimentation.

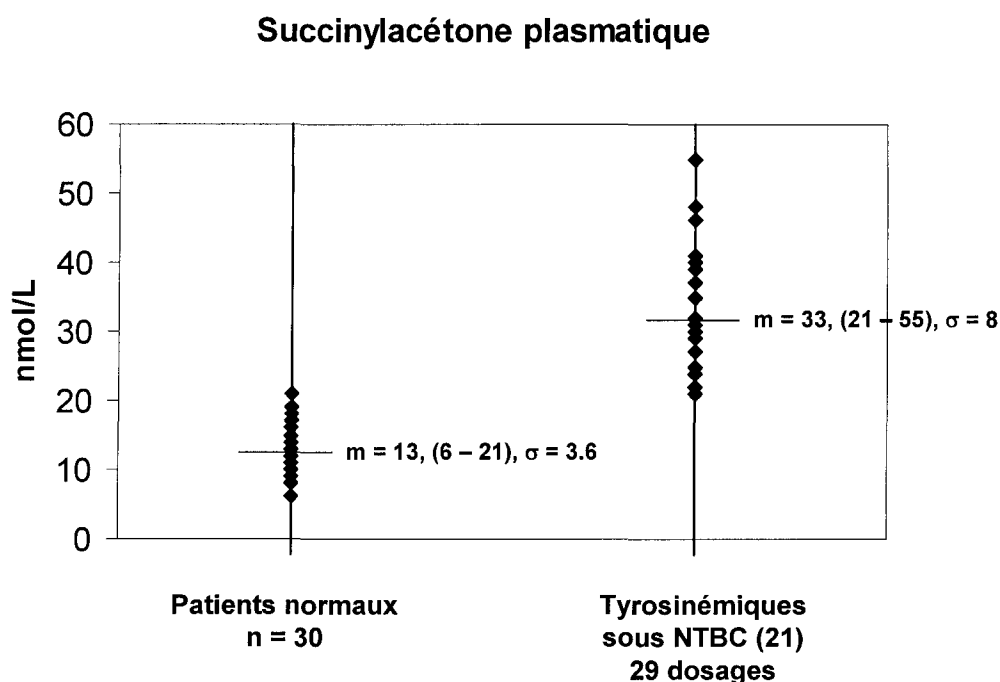


Figure 10. Les valeurs de référence plasmatiques du SA chez des patients normaux versus des patients traités au NTBC. Ces derniers sont traités depuis au moins 7 mois.

Des substances urinaires interférentes aux ions moléculaires du SA et du $^{13}\text{C5-SA}$ ciblés par le spectromètre de masse sont parfois présentes et rendent la quantification difficile. De plus, l'analyse de 11 urines de patients sous traitement a montré que ce test est beaucoup moins spécifique pour le suivi de ces patients comparativement au dosage plasmatique. En effet, la plupart des patients traités ont un taux de SA se situant dans la normale (figure 11 et tableau 3).

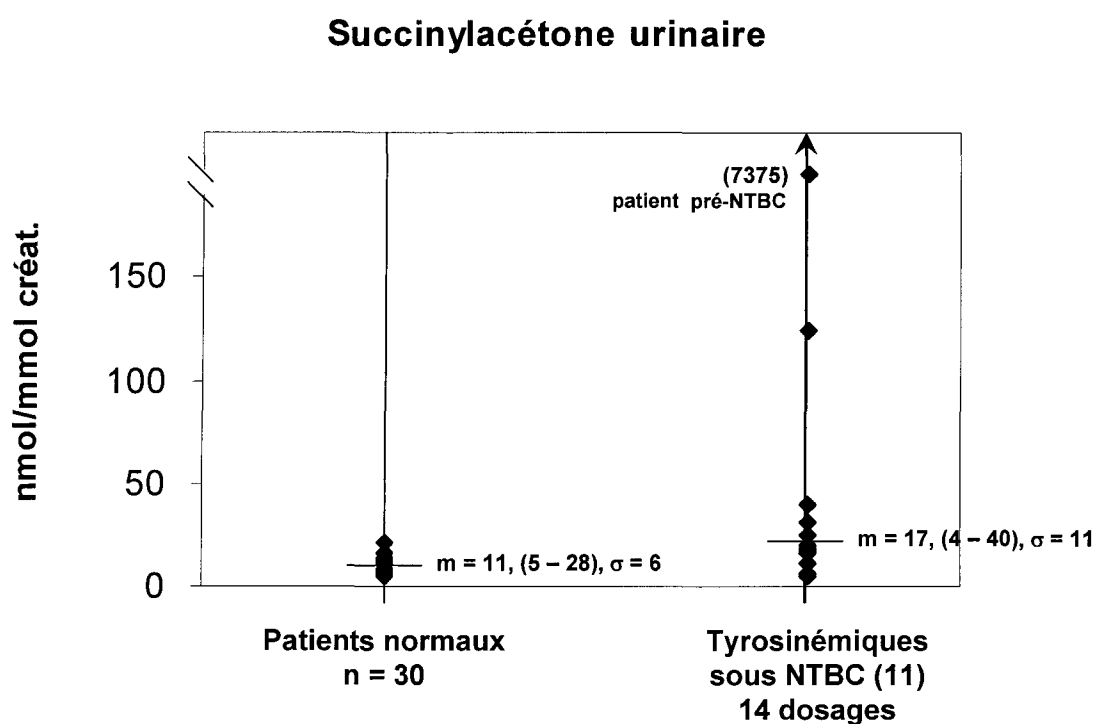


Figure 11. Les valeurs de référence urinaires du SA chez des patients normaux versus des patients traités au NTBC. Ces derniers sont traités depuis au moins 7 mois.

En plus des substances interférentes présentes dans l'urine, le métabolite subit une dilution plus ou moins importante selon le volume urinaire excrété, il est ensuite normalisé en exprimant le taux par rapport à la créatinine urinaire, ajoutant ainsi un facteur d'erreur. Pour toutes ces raisons, la détermination du SA urinaire ne sera pas préconisée pour le suivi des patients traités mais demeurera utile pour le diagnostic.

Tableau 3

Valeurs du urinaires du SA pour les patients TH1 et contrôles

Patients #	Age ^a	SA ^b (umol/mmol créatinine)
1	4 ans	20
2	3 ans	17
3	3 ans	7
		31
4	4 ans	11
		25
5	11 ans	6
6	12 ans	4
		124
7	9 ans	7
8	9 ans	16
9		18
10	4 ans	40
11	2 sem.	7375 ^c
Controls n=30	4 mois à 12 ans	11 ^d intervalle : 5 - 28

^a Age au dosage

^b SA pendant le traitement (depuis 7 mois au minimum)

^c Avant NTBC

^d Moyenne pour les contrôles

Pendant le déroulement de la présente étude, nous avons pu vérifier l'efficacité de notre méthode par l'analyse de deux liquides amniotiques obtenus de mères porteuses de fœtus atteints de TH1 (figures 9 de la discussion et figure 5 de l'article). De plus, nous avons pu suivre la réponse pharmacologique au NTBC chez un patient atteint de TH1. La figure 6 de l'article montre une courbe de diminution du SA plasmatique débutant deux

jours après le début du traitement et atteignant un plateau 15 semaines plus tard. Ce genre de résultats n'avait encore jamais été publié.

5. La conclusion et les perspectives

La méthode de dosage du SA par GC/MS décrite dans ce document possède la sensibilité analytique, la précision et l'exactitude nécessaire pour effectuer un diagnostic prénatal, postnatal et le suivi de patients traités. Nous avons démontré son efficacité analytique et son utilité clinique. Par contre cette méthode est non applicable pour un dépistage de masse puisqu'elle nécessite des quantités de liquides biologiques variant entre 0.5 et 1 ml et demande un temps d'analyse ne permettant guère de tester plus de 36 échantillons par appareil / jour. Cependant, si un doute ou une ambiguïté persiste à la suite d'un test de dépistage, qui utilise une méthode enzymatique, la présente méthode pourrait être utilisée comme test de confirmation même si, comme mentionné auparavant, l'atteinte du nanomolaire n'est pas nécessaire au dépistage. La venue du LC-MS/MS rehaussera sans doute dans le futur le dépistage de masse de la TH1 en dosant le SA directement dans le sang séché sur papier filtre. La TH1 sera alors ajouté à la trentaine d'EIM déjà dépistées par un dépistage néonatal effectué par LC-MS/MS implanté désormais dans plusieurs pays. Cette façon de faire permet une détection rapide de plusieurs marqueurs biochimiques avec une grande spécificité, mais la mesure est semi-quantitative (pas de courbe d'étalonnage). À l'instar des EIM dépistées par LC-MS/MS dans le cadre d'un dépistage, le suivi des

patients atteints de TH1 sera probablement effectué par des méthodes offrant une quantification plus exacte et précise. Notre méthode saura alors répondre à ce besoin.

L'effet à long terme du NTBC reste à être étudié mais sa toxicité potentielle motive certains groupes de chercheurs à trouver des alternatives. Dans ce contexte, le dosage du SA est un indicateur précis de la réponse à un éventuel médicament ou thérapie. Notre méthode sensible, spécifique et validée pourra être mise à profit.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier particulièrement le Dr Régen Drouin de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce beau défi et pour ses judicieux conseils. Des remerciements particuliers au Dr Bernard Lemieux, qui m'a donné ma chance il y a 15 ans et qui m'a toujours encouragé à poursuivre aux études graduées. Je remercie également les membres du laboratoire de génétique biochimique pour leur support et leur compréhension, particulièrement à M. Robert Giguère biochimiste clinique responsable du laboratoire. Pour terminer, je remercie les personnes que j'aime plus que tout : ma conjointe Edith qui m'a supporté dans ce projet et, surtout, a accepté cette quasi monoparentalité passagère. Sans ton amour inconditionnel je n'aurais pu atteindre cet objectif. Mes trois perles, Geneviève, Marie-Pier et Émilie, excusez mes absences. Vous aurez compris qu'il faut parfois payer le prix pour aller au bout de nos attentes, mais la satisfaction est si grande... accrochez-vous à vos rêves.

RÉFÉRENCES

- Allard, P., Grenier, A., Korson, MS., Zytkevich, TH. (2004). Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry : analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clin. Biochem.* **37**:1010.
- Berger, R., van Faassen, H., Smith, G.P. (1983). Biochemical studies on the enzymatic deficiencies in hereditary tyrosinemia. *Clin. Chim. Acta.* **31**:129.
- Bergeron, P., Laberge, C., Grenier, A. (1974) Hereditary tyrosinemia in the province of Quebec : Prevalence at birth and geographic distribution. *Clin. Genet.* **5**:157.
- Bopp, F. (1849). Einiges über albumin, casein und fibrin. *Ann. Chem. Pharm.* **69**:16.
- Cansever, M.S., Erim, F.B. (2005). Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I. *J. Chromatogr. B* **25**:309.
- Chace, D. (2001). Mass spectrometry in clinical laboratory. *Chem. Rev.* **101**:445.
- Cyr, D., Giguère, R., Lemieux, B. (1995). Les organo-acidopathies : des maladies métaboliques nées de l'évolution technologique. *Le clinicien.* **10**:149.
- De Braekeleer, M., Larochelle, J. (1990). Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and in Saguenay-Lac-St-Jean. *Am. J. Hum. Genet.* **47**:302.
- Ellerbe, P., Phinney, C.S., Sniegowski, L.T., Welch, M.J. (1999). Validation of new instrumentation for isotope dilution mass spectrometric determination of organic serum analytes. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **104**:141.
- Garrod, A. (1902). The Incidence of Alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality. *Lancet.* vol. **ii**:1616.

- Giovannini, M.G., Pieraccini, G., Moneti, G. (1991). Isotope dilution mass spectrometry: definitive methods and reference materials in clinical chemistry. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **27**:401.
- Goulden, K.J., Moss, M.A., Cole, D.E., Tithecott, G.A., Crocker, J.F. (1987). Pitfalls in the initial diagnosis of tyrosinemia: three case reports and a review of the literature. *Clin. Biochem.* **20**:207.
- Grenier, A., Laberge, C. (1974). A modified automated fluorometric method for tyrosine determination in blood spotted on paper: a mass screening procedure for tyrosinemia. *Clin. Chim. Acta.* **20**:71.
- Grenier, A., Belanger, L., Laberge, C. (1976). Alpha1-Fetoprotein measurement in blood spotted on paper: discriminating test for hereditary tyrosinemia in neonatal mass screening. *Clin. Chem.* **22**:1001.
- Grenier, A., Lescault, A. (1985). Succinylacetone. In : Bergmeyer, H.V. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn, Vol. 8, Weinheim, Germany. p.73.
- Grompe, M., St-Louis, M., Demers, S.I., al-Dhalimy, M., Leclerc, B., Tanguay, R.M. (1994). A single mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in French Canadians with hereditary tyrosinemia type I. *N. Engl. J. Med.* **11**:353.
- Hendriksz, C.J., Walter, J.H. (2004). Feeding infants with undiluted goat's milk can mimic tyrosinaemia type 1. *Acta Paediatr.* **93**:552.
- Holme E, Lindstedt S. (1998). Tyrosinaemia type I and NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione). *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**:507.
- Hubert, P.H. (2003). Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. *S.T.P. Pharma. pratiques.* **13**:101.

- Jakobs, C., Dorland, L., Wikkerink, B., Kok, R.M., de Jong, A.P., Wadman, S.K. (1988). Stable isotope dilution analysis of succinylacetone using electron capture negative ion mass fragmentography: an accurate approach to the pre- and neonatal diagnosis of hereditary tyrosinemia type I. *Clin. Chim. Acta.* **15**:223.
- Kvittingen, E.A., Brodtkorb E. (1986). The pre- and post-natal diagnosis of tyrosinemia type I and the detection of the carrier state by assay of fumarylacetoacetase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **184**:35.
- Laberge, C., Grenier, A., Valet, J.P., Morissette, J. (1990). Fumarylacetoacetase measurement as a mass screening procedure for hereditary tyrosinemia type I. *Am. J. Hum. Genet.* **47**:325.
- Larochelle, J., Mortezaei, A., Belanger, M., Tremblay, M., Claveau, J.C., Aubin, G. (1967). Experience with 37 infants with tyrosinemia. *Can. Med. Assoc. J.* **97**:1051.
- Lindblad, B., Lindstedt, S., Steen, G. (1977). On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:4641.
- Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O, Strandvik B. (1992). Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet.* **340**:813.
- Mamer, O.A. (1996). Stable isotope dilution techniques. *J. Chromatogr. B* **682**:182.
- McInnes, R., Clark, J. (2002). Metabolic Disorders. In : Rudolph AM (Ed.). *Rudolph's Pediatrics*, 21st edn. McGraw-Hill, New York, p. 597.
- Mitchell, G.A., Grompe, M., Lambert, M., Tanguay, R.M. (2001). In: Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W., Vall, D (Eds). Hypertyrosinemia. In : *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp.1777.
- Paradis, K. (1996). Tyrosinemia: the Quebec experience. *Clin. Invest. Med.* **19**:311.

- Pettit, B.R., Kvittingen, E.A., Leonard, J.V. (1985). Early prenatal diagnosis of hereditary tyrosinaemia. *Lancet*. **4**:1038.
- Phaneuf D, Labelle Y, Berube D, Arden K, Cavenee W, Gagne R, Tanguay RM. (1991). Cloning and expression of the cDNA encoding human fumarylacetoacetate hydrolase, the enzyme deficient in hereditary tyrosinemia: assignment of the gene to chromosome 15. *Am. J. Hum. Genet.* **48**:525.
- Phaneuf D, Lambert M, Laframboise R, Mitchell G, Lettre F, Tanguay RM. (1992). Type 1 hereditary tyrosinemia. Evidence for molecular heterogeneity and identification of a causal mutation in a French Canadian patient. *J. Clin. Invest.* **90**:1185.
- Rashed. M.S., Al-Ahaidib, L.Y., Al-Dirbashi, O.Y., Al Amoudi, M., Al-Sayed, M.M., Rahbeeni, Z., Al-Hassnan, Z., Al-Dbas, A., Al-Owain, M., Ni Luanaigh, M. (2005). Tandem mass spectrometric assay of succinylacetone in urine for the diagnosis of hepatorenal tyrosinemia. *Anal. Biochem.* **15**:310.
- Rice, D.N., Houston, I.B., Lyon, I.C, Macarthur, B.A., Mullins, P.R., Veale, A.M., Guthrie, R. (1989). Transient neonatal tyrosinemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* **12**:13.
- Rinaldo, P., Hahn, S. Matern, D. (2004). Clinical biochemical genetics in the twenty-first century. *Acta Paediatr. Suppl.* **445**: 22.
- Russo, P.A., Mitchell, G.A., Tanguay, R.M. (2001). Tyrosinemia: a review. *Pediatr. Dev. Pathol.* **4**:212.
- Sakai, K., Kitagawa, T. (1957). An atypical case of tyrosinosis (1-para-hydroxyphenyllactic aciduria): I. Clinical and laboratory findings. *Jikei. Med. J.* **2**:1.
- Scriver, C.R., Larochelle, J., Silverberg, M. (1967). Hereditary tyrosinemia and tyrosyluria in a French Canadian geographic isolate. *Am. J. Dis. Child.* **113**:41.

- Shinka T, Ohse M, Inoue Y, Kuhara T. (2005). Stability of 5-aminolevulinic acid on dried urine filter paper for a diagnostic marker of tyrosinemia type I. *J. Chromatogr. B* **823**:44.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R. und Wood, R. (2002). Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.* **74**:835.
- Tuchman, M., Whitley, C.B., Ramnaraine, M.L., Bowers, L.D., Fregien, K.D., Krivit, W. (1984). Determination of urinary succinylacetone by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **22**:211.
- Van Spronsen, F.J., Thomasse, Y., Smit, G.P., Leonard, J.V., Clayton, P.T., Fidler, V., Berger, R., Heymans, H.S. (1994). Hereditary tyrosinemia type I: a new clinical classification with difference in prognosis on dietary treatment. *Hepatology*. **20**:1187.
- Yandza, T., Gauthier, F., Valayer, J. (1994). Lessons from the first 100 liver transplantations in children at Bicetre Hospital. *J. Pediatr. Surg.* **29**:905.

ANNEXES

La réponse de l'éditeur

De : "Journal of Chromatography B" <chromb@elsevier.com>
Date : Mon, 07 Nov 2005 12:30:45 -0000
À : <Regen.Drouin@usherbrooke.ca>
Objet : Manuscript JCB-05-418R1

Ms. No.: JCB-05-418R1

Dear Dr. Drouin,


On behalf of the editor handling your manuscript, Prof. Gerard Hopfgartner, PhD, I am writing to you in reference to your manuscript entitled:


"A GC/MS validated method for the nanomolar range determination of succinylacetone in amniotic fluid and plasma : an analytical tool for tyrosinemia type I."

I am pleased to inform you that the paper has been favorably received and that publication after minor revision is recommended (please see the comments below). I should be grateful if you would revise the paper in accordance with these recommendations.

Please submit your revision online by logging onto the Elsevier Editorial System for Journal of Chromatography B:

<http://ees.elsevier.com/chromb/>

Your username is: 

Your password is: 

The manuscript record can be found in the "Submissions Needing Revision" menu.

Please upload the following items:

1. A detailed, point-to-point response to each point raised, specifically describing all changes, or the reason why no change was made. This document should be uploaded as "Response to Reviews".
2. A complete, editable, electronic copy (i.e. Word, WordPerfect, RTF, or LaTeX) of the revised manuscript.
3. An electronic copy of the revised manuscript that has all changes made in response to these comments clearly indicated (preferably underlined in red). Please identify such a marked copy on the title page and in the file name. This document should be uploaded as an "Marked Manuscript".
4. Figures should be uploaded individually as TIF or EPS files with the figure number clearly indicated in the file name.

Thank you for your cooperation.

We look forward to receiving your revised manuscript.

Kind regards,

Marjon Jekel
Journal Manager
Journal of Chromatography B

Comments:

EDITORIAL OFFICE:

Please note that pdf source files will cause problems at the production stage. As chances increase that the editor will accept your paper after revision, you are therefore advised not to submit any pdf source file when submitting the revision. Please use MS Word/Latex for manuscript text and jpg/tiff/eps for figures.

Reviewer #1: This manuscript has been improved after revision. I think, it can be published on J. Chromatogr. B after further revision concerning References:

Some errors occurred in the reference 11 and 20. In addition, The Reference format should carefully be revised according to the requirement of the journal.

Some errors occurred in the following references ([11] and [20]):

Reference 11

[11] Shroads AL, Henderson GN, Cheung J, James MO, Stacpoole PW
Unified gas chromatographic-mass spectrometric method for quantitating tyrosine metabolites in urine and plasma
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES 808 (2): 153-161 SEP 5 2004

It should be cited as follow:

[11] A.L. Shroads, G.N. Henderson, J. Cheung, M.Q. James, P.W. Stacpoole, J. Chromatogr. B 808 (2004) 153.

Not:

[11] Al Shroads, GN Hendreson, J Cheung et al., J Chromatogr B 808 (2005) 153-161.

Reference 20:

[20] C Deng, W Zhang, J Zhang, X Zhang, J Chromatogr B 805 (2004) 235-240.

It should be:

[20] C.H. Deng, W. Zhang, J. Zhang, X.M. Zhang, J. Chromatogr. B 805 (2004) 235.

LE DOSAGE DU SUCCINYLACÉTONE par GC/MS : PROTOCOLE ANALYTIQUE

Préparation des standard et standard interne :

STD 3 = 50 nM/L : (à conserver dans une boîte au congélateur à -80°C)

- Peser 20 mg de succinylacétone (PM = 158.2 gr)
- Mettre dans un ballon de 1 L et ajuster à la jauge avec H₂O (solution mère) (ne pas refaire solution mère à chaque fois, bon pour quelques mois)
- Prendre 0.2 ml (200 ul) de la solution mère, déposer dans un ballon de 500 ml et ajuster à la jauge avec H₂O (= STD 3)

ISTD = 100 nM/L : (à conserver dans une boîte au congélateur à -80°C)

- Solution mère de succinylacétone-¹³C : à partir de bouteille de 10 mg, ajouter 2 ml H₂O, bien dissoudre
- Prendre 13 ul de cette solution mère et déposer dans un ballon 200 ml, compléter à la jauge avec H₂O (= ISTD 100 nM/L)

Technique :

- Dans les 3 premiers tubes en polypropylène (PP) 12 x 75 mm, mettre respectivement :
 Tube 1 = 100 ul de std 3 + 900 ul H₂O (concentration finale = 5 nM)
 Tube 2 = 500 ul de std 3 + 500 ul H₂O (concentration finale = 25 nM)
 Tube 3 = 1 ml de std 3 (concentration finale = 50 nM)
- Dans le tube #4, mettre 1 ml H₂O (Blanc)
- Dans les autres tubes, mettre 1 ml de liquide amniotique ou 0.5 ml de plasma
- Ajouter dans tous les tubes 50 ul de la solution de ISTD 100 nM (1 aliquot/24 échantillons) (changer l'embout de la pipette après le std 3 (3^{ième} tube) pour éviter toute contamination)
- Ajouter 100 ul de PFBO (50 mg/ml, bouteille dédiée pour le succinylacétone L.A., changer l'embout de la pipette après le std 3 (3^{ième} tube) pour éviter toute contamination)
- Ajouter 40 ul de H₂SO₄ 0.25M (changer l'embout de la pipette après le std 3 (3^{ième} tube) pour éviter toute contamination)
- Incuber 1 heure à température de la pièce
- Ajouter 40 ul de HCl 5N (changer l'embout de la pipette après le std 3 (3^{ième} tube) pour éviter toute contamination)
- Saturer avec NaCl (NaCl dédié pour cette technique, laver la spatule, ne pas prendre l'entonnoir pour les standards, seulement la pointe d'une spatule)
- Extraire 2 fois avec 2 ml d'acétate d'éthyle (éviter de toucher le tube avec l'embout du distributeur)
- Extraire 2 fois avec 2 ml d'éther (éviter de toucher le tube avec l'embout du distributeur)
- Brasser et centrifuger entre les extractions et combiner les phases organiques dans des tubes coniques en PP 15 ml
- Sécher sous azote
- Ajouter 100 ul de régisil
- Dérivé 1 heure à 70°C
- Déposer dans les vials et injecter

Méthode, template et database

Méthode : SUCCINYLACÉTONE.M

Template : SUCCLA.CRT

Database : SUCCINYLACETONE LA.CRD

LA LETTRE D'APPROBATION DES CO-AUTEUR(E)S

L'autorisation d'intégration d'un article écrit en
collaboration à un mémoire ou une thèse a été retirée à
cause des renseignements personnels